

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de
los Alimentos**



**ASPECTOS HIGIÉNICOS, SEGURIDAD Y POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO DE ENTEROCOCOS AISLADOS DE
ÁNADES REALES (ANAS PLATYRHYNCHOS).
CARACTERIZACIÓN
BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE SUS BACTERIOCINAS Y
PRODUCCIÓN HETERÓLOGA EN DIVERSOS
HOSPEDADORES.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

JORGE SÁNCHEZ RUIZ

Bajo la dirección de los doctores
Pablo E. Hernández Cruza y Luis M. Cintas Izarra

Madrid, 2008

• ISBN: 978-84-692-5069-3

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



ASPECTOS HIGIÉNICOS, SEGURIDAD Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ENTEROCOCOS AISLADOS DE ÁNADES REALES (*Anas platyrhynchos*). CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE SUS BACTERIOCINAS Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA EN DIVERSOS HOSPEDADORES.

TESIS DOCTORAL

JORGE SÁNCHEZ RUIZ

Madrid, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



ASPECTOS HIGIÉNICOS, SEGURIDAD Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ENTEROCOCOS AISLADOS DE ÁNADES REALES (*Anas platyrhynchos*). CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE SUS BACTERIOCINAS Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA EN DIVERSOS HOSPEDADORES.

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”, presenta el Licenciado Jorge Sánchez Ruiz

Madrid, septiembre de 2008



**Departamento de Nutrición,
Bromatología y Tecnología de los
Alimentos Facultad de Veterinaria**

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA Y LUIS M. CINTAS IZARRA, CATEDRÁTICO Y PROFESOR CONTRATADO DOCTOR, RESPECTIVAMENTE, DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada "Aspectos higiénicos, seguridad y potencial biotecnológico de los enterococos aislados de ánades reales (*Anas platyrhynchos*). Caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas y producción heteróloga en diversos hospedadores", de la que es autor el Licenciado en Veterinaria **D. Jorge Sánchez Ruiz**, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección conjunta de los que suscriben y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con mención honorífica de "Doctorado Europeo".

Madrid, 19 de septiembre de 2008

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Pablo E. Hernández Cruza

Luis M. Cintas Izarra

A mis padres
A mis hermanos Sergio y Oscar
A mis abuelos
A Laura

Me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que, de una manera u otra, voluntaria o involuntariamente, han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, y de manera muy especial, quisiera dar las gracias a mis directores de tesis por la oportunidad que me han brindado de formar parte de este grupo de investigación y así haber conocido desde dentro este bonito y a su vez sacrificado mundo. A Luis Cintas, por tu continua orientación y consejo durante todo este tiempo, así como por las charlas desenfadadas y "despresurizantes" de tantas largas e interminables tardes de ciencia, "cacharreo" y laboratorio. A Pablo Hernández, por tu constante supervisión, total implicación y sincera preocupación por el desarrollo de los experimentos. Aunque ello implicará que no pocas veces supieras antes que yo el resultado y la fase de desarrollo de los mismos, debido a tus frecuentes visitas a las estufas y cuadernos de laboratorio. No olvidaré las largas charlas en tu despacho, en las que tratamos gran diversidad de temas, tanto profesionales como personales, plagadas de consejos y anécdotas de todo tipo, siempre con un tono casi paternal. Aunque nuestros pareceres a veces no coincidían, siempre he aprendido y he sacado conclusiones muy útiles de dichas charlas. Espero que la tradición no se pierda y, de cuando en cuando, sigamos teniendo estos encuentros.

También quisiera agradecer muy especialmente a Bea y Antonio, mis dos compañeros de fatigas, el apoyo recibido durante todo este tiempo. Y digo muy especialmente, porque son los dos compañeros con los que he coincidido durante toda mi estancia en este grupo. Antonio ya era amigo mío de la Facultad, aunque el haber realizado juntos esta etapa tan importante y haber compartido tres meses de estancias en Noruega me ha permitido conocerle mucho mejor y consolidar nuestra amistad. Conocer a Bea fue, sin embargo, una coincidencia por la que realizar esta tesis ya mereció la pena. Juntos, los tres, hemos empezado, hemos aprendido, hemos enseñado, hemos metido la pata, hemos rectificado y hemos concluido esta larga etapa de trabajo en el laboratorio. Hemos pasado muy buenos momentos así como momentos difíciles en los que nada salía y todo eran obstáculos. En definitiva, me ha enriquecido mucho vuestra presencia, tanto dentro como fuera del laboratorio, cada uno a su manera, y en mi mente quedan grabados un sinfín de buenos momentos en los que, de verdad, he disfrutado. No sé si hubiera conseguido llevar a término esta tesis si no hubiera tenido dos compañeros como vosotros. Gran parte de esta tesis es vuestra. Muchas gracias.

A Juan y Loreto, relativamente recientes incorporaciones al grupo de investigación, con los que también he compartido mis últimos meses en el laboratorio. Aunque haya sido breve el período de tiempo que hemos coincidido, ha sido más que suficiente para comprobar lo fácil y gratificante que es convivir y trabajar con vosotros, a pesar de las estrecheces propias de las instalaciones. Gracias Juan por haber sido tan buen "pupilo" al inicio de tus andaduras en este grupo y por los cables que me has echado en el laboratorio. A los últimos "fichajes" de "punto Lab", Juango y Cristina, por la ilusión y ganas tan contagiosas y necesarias propias de los que empiezan.

A los que pasaron antes que yo por este trance y me enseñaron parte de lo que sé: María, Jorge, Rosanna y Raquel. En especial a María, que me guió mientras daba los primeros pasos por el Departamento.

A todos los profesores del Departamento que he conocido durante estos años, que de una forma u otra han aportado su grano de arena para la realización de esta tesis. A los compañeros de los laboratorios "anexos": Belén, Inés, Violeta, Álvaro, Almudena, Irene, María, Miguel Ángel, Esther, Rocío y Antonio Maldonado por hacer más soportables las largas jornadas de purificaciones, curvas de crecimiento, incubaciones, etc., amenizar las comidas y contribuir al buen ambiente de trabajo.

Thanks to Dr Ingolf F. Nes (Laboratory of Microbial Gene Technology, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway) for accepting me in his lab and to Dzung B. Diep for his patience, his teaching, the supervision of my research work and, of course, for going fishing in his boat. Also thanks to Brede and Zhián for their kindness, conversations and breakfasts in the Lab.

Igualmente, quisiera agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la concesión de una beca predoctoral del Programa Nacional de Formación del Profesorado Universitario (FPU), así como la ayuda para la estancia investigadora en Ås (Noruega). Asimismo, el trabajo realizado ha sido posible gracias a los fondos concedidos por la Comunidad de Madrid (Proyecto S-0505/AGR/0265) y por el Ministerio de Educación y Ciencia (Proyectos AGL-2003-01508 y AGL-2006-01042).

A mis amigos del "mundo exterior" que tantas veces me han preguntado "¿pero cuando acabas la tesis esa?". A los amigos del barrio de toda la vida por haber compartido tantas cosas y tantas etapas decisivas: Sando, Dampi, Oscar, Ponce, Adela, Félix, Jesús y Fran. A los camaradas y compadres del fútbol con los que he disfrutado de "terceros tiempos" gloriosos y memorables marchas en la montaña, siendo el fútbol una mera excusa para vernos todas las semanas: Yago, Alberto,

Edu, Pablo, Valen, Mine y Miguel. A Isrá y Miguel Ángel, amigos y compañeros del turno de tarde de la facultad. A Manolo, gran amigo del colegio y de la facultad, compañero de viajes y "transfuga" de profesión como yo, al que siempre he admirado por ser un maestro de la vida y tener, pase lo que pase, una sonrisa constante en la boca y contagiársela a los que están con él. A Jose, Nacho y Bosco, por ser tan genuínos y ayudarme, posiblemente sin saberlo, a ver las cosas con una perspectiva diferente, a través de un prisma de distinto color. Todos vosotros me habéis ayudado a desconectar, a cambiar de registro, a confirmar que hay vida después del laboratorio.

A mi familia, por creer en mí y aguantarme durante todo este tiempo. Sé que ha habido momentos en los que esta prosaica labor (la de aguantarme) ha sido especialmente difícil. A mis padres, que tanto se han sacrificado por mí. Por su continuo cariño y preocupación. Por haberme apoyado en todo desde siempre. Lo que soy y lo que tengo se lo debo a ellos. A mis hermanos Sergio y Oscar, con los que mantengo una estrecha relación, por ayudarme a reírme de todo y a relativizar la importancia de las cosas, a menudo a través de un humor absurdo e inteligente. A mis abuelos Isi, Isa, Juan y Angeles que, aunque han tenido una vida dura, llena de privaciones y apenas pudieron acudir a la escuela, siempre me han animado a estudiar una carrera, y en la sencillez y sabiduría que dan los años me decían "eso es para ti para siempre, eso no te lo quita nadie". Sé que estarán muy orgullosos. A Laura, a la que quiero un montón, por su alegría y constante apoyo, porque, aunque suene a tópico, ha estado siempre ahí, de "Pepito Grillo", con su gran bondad y sentido de la responsabilidad tan desarrollado, puesto que es mucho más constante y disciplinada que yo, contribuyendo notablemente a que este trabajo llegue a buen puerto.

"Después de todo, el microbio es como el hombre, se alimenta como puede"
Rámon Gómez De La Serna

"La falta de la humanidad de la computadora consiste en que una vez se le
programa y trabaja adecuadamente, su honradez es intachable"
Isaac Asimov

"A cojón visto, macho"
Saber popular

"La vida es como un juego de cartas. La mano que le ha tocado representa el
determinismo, la forma que usted juega es su libre albedrío"
Jawaharlal Nehru

ÍNDICE

	Página
RESUMEN/SUMMARY	1
CAPÍTULO I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR Y DE LOS OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	
CHAPTER I. GENERAL ACCOUNT OF THE OBJECTIVES AND AIMS OF THE RESEARCH PROBLEM	11
CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN GENERAL	21
<u>II.1. ASPECTOS FUNCIONALES Y DE SEGURIDAD DE LOS ENTEROCOCOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA</u>	23
II.1.1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS	23
II.1.2. EL GÉNERO <i>Enterococcus</i>	23
II.1.3. ASPECTOS FUNCIONALES DE LOS ENTEROCOCOS	27
II.1.3.1. Concepto de bioconservante de los alimentos	27
II.1.3.2. Bacteriocinas de las bacterias lácticas	29
II.1.3.2.1. <i>Definición y clasificación</i>	29
II.1.3.2.2. <i>Propiedades físico-químicas</i>	30
II.1.3.2.3. <i>Purificación de las bacteriocinas</i>	31
II.1.3.2.4. <i>Espectro de acción antimicrobiana</i>	32
II.1.3.2.5. <i>Modo de acción</i>	33
II.1.3.2.6. <i>Organización genética y biosíntesis</i>	35
II.1.3.3. Consideraciones sobre las bacteriocinas de la clase IIa y las bacteriocinas sintetizadas sin secuencia líder o péptido señal	38
II.1.3.3.1. <i>Bacteriocinas de la clase IIa</i>	38
II.1.3.3.2. <i>Bacteriocinas sintetizadas sin secuencia líder o péptido señal</i>	42
II.1.4. ASPECTOS DE SEGURIDAD DE LOS ENTEROCOCOS	44
II.1.4.1. Los enterococos como patógenos oportunistas	44
II.1.4.2. Factores de virulencia de los enterococos	46
II.1.4.2.1. <i>Sustancia de agregación</i>	46
II.1.4.2.2. <i>Proteína de superficie de enterococos</i>	47
II.1.4.2.3. <i>Otras adhesinas de importancia en enterococos</i>	48
II.1.4.2.4. <i>Gelatinasa</i>	50
II.1.4.2.5. <i>Citolisina o hemolisina β</i>	50
II.1.4.2.6. <i>Resistencia a antibióticos y mecanismos de transferencia</i>	53
II.1.4.3. Enterococos como cultivos iniciadores o probióticos	55
<u>II.2. PROCESAMIENTO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS LÁCTICAS</u>	57
II.2.1. SISTEMA TRANSPORTADOR-ABC O DE TRANSPORTE DEDICADO (DTS)	57
II.2.2. RUTA GENERAL DE SECRECIÓN (GSP) O SISTEMA SEC-DEPENDIENTE	61
II.2.2.1. Modelo co-traducciona	63
II.2.2.2. Modelo post-traducciona	63
II.2.2.3. Mecanismo de translocación	64
<u>II.3. PROCESAMIENTO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN LEVADURAS</u>	66

II.4. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS	67
II.4.1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS EN BACTERIAS LÁCTICAS	68
II.4.1.1. Producción heteróloga basada en la expresión de genes nativos	68
II.4.1.2. Producción heteróloga basada en el intercambio de sistemas de procesamiento, transporte y secreción	72
II.4.1.2.1. Producción de bacteriocinas mediante el intercambio de secuencias líder y/o de genes del sistema transportador-ABC o sistema de transporte dedicado (DTS)	72
II.4.1.2.2. Producción de bacteriocinas mediante el intercambio de secuencias líder por péptidos señal reconocidos por la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente	74
II.4.1.3. Optimización de la producción heteróloga de péptidos y proteínas en las bacterias lácticas	77
II.4.2. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS EN LEVADURAS	79
II.5. EL ÁNADE REAL (<i>Anas platyrhynchos</i>)	81
II.5.1. BIOLOGÍA DEL ÁNADE REAL	81
II.5.2. ¿POR QUÉ EL ÁNADE REAL?	86
CAPÍTULO III. ASPECTOS HIGIÉNICOS, SEGURIDAD Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ENTEROCOCOS BACTERIOCINOGENÉTICOS AISLADOS DE ÁNADES REALES (<i>Anas platyrhynchos</i>)	
CHAPTER III. ANTIMICROBIAL AND SAFETY ASPECTS, AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF BACTERIOCINOGENIC ENTEROCOCCI ISOLATED FROM MALLARD DUCKS (<i>Anas platyrhynchos</i>)	89
CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA Y NUCLEOTÍDICA DE LA HIRACINA JM79, UNA BACTERIOCINA SEC-DEPENDIENTE PRODUCIDA POR <i>Enterococcus hirae</i> DCH5	
CHAPTER IV. AMINO ACID AND NUCLEOTIDE SEQUENCE, ADJACENT GENES, AND HETEROLOGOUS EXPRESSION OF HIRACIN JM79, A SEC-DEPENDENT BACTERIOCIN PRODUCED BY <i>Enterococcus hirae</i> DCH5, ISOLATED FROM MALLARD DUCKS (<i>Anas platyrhynchos</i>)	103
CAPÍTULO V. CLONACIÓN Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA HIRACINA JM79, UNA BACTERIOCINA SEC-DEPENDIENTE PRODUCIDA POR <i>Enterococcus hirae</i> DCH5, EN OTRAS BACTERIAS LÁCTICAS Y <i>Pichia pastoris</i>	
CHAPTER V. CLONING AND HETEROLOGOUS PRODUCTION OF HIRACIN JM79, A SEC-DEPENDENT BACTERIOCIN PRODUCED BY <i>Enterococcus hirae</i> DCH5, IN LACTIC ACID BACTERIA AND <i>Pichia pastoris</i>	115
CAPÍTULO VI. <i>Enterococcus faecalis</i> DBH18, AISLADO DE ÁNADES REALES (<i>Anas platyrhynchos</i>), CODIFICA LOS GENES <i>ef1097</i> Y <i>entL50A-entL50B</i>, RESPONSABLES DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS, Y UN GEN SIMILAR AL <i>entL50B</i> DENOMINADO <i>entJS</i>	
CHAPTER VI. <i>Enterococcus faecalis</i> DBH18, ISOLATED FROM MALLARD DUCKS (<i>Anas platyrhynchos</i>), ENCODES THE BACTERIOCIN-PRODUCING GENES <i>ef1097</i>, <i>entL50A-entL50B</i> AND AN <i>entL50B-like</i> gene, termed <i>entJS</i>	127
CAPÍTULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL	163
VII.1. ASPECTOS HIGIÉNICOS, SEGURIDAD Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ENTEROCOCOS BACTERIOCINOGENÉTICOS AISLADOS DE ÁNADES REALES (<i>Anas platyrhynchos</i>)	165
VII.1.1. IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y DETECCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN BACTERIOCINAS Y FACTORES POTENCIALES DE VIRULENCIA	166
VII.1.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN LOS AISLADOS DE <i>E. faecium</i>	170
VII.1.3. SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA DE LOS GENES QUE CODIFICAN BACTERIOCINAS	171

VII.1.4. PURIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>E. hirae</i> DCH5 y <i>L. garvieae</i> DCC43	172
VII.1.5. ASPECTOS FUNCIONALES Y DE SEGURIDAD DE LOS ENTEROCOCOS AISLADOS DE ÁNADES REALES	173
VII.2. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA Y NUCLEOTÍDICA DE LA HIRACINA JM79, UNA BACTERIOCINA SEC-DEPENDIENTE PRODUCIDA POR <i>Enterococcus hirae</i> DCH5	174
VII.2.1. ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR <i>E. hirae</i>	174
VII.2.2. SECUENCIACIÓN AMINOACÍDICA Y NUCLEOTÍDICA DE LA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR <i>E. hirae</i> DCH5	174
VII.2.3. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA Y EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA HIRACINA JM79 EN <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>E. faecalis</i> Y <i>E. faecium</i>	178
VII.3. CLONACIÓN Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA HIRACINA JM79, UNA BACTERIOCINA SEC-DEPENDIENTE PRODUCIDA POR <i>Enterococcus hirae</i> DCH5, EN OTRAS BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) Y <i>Pichia pastoris</i>	180
VII.3.1. CLONACIÓN Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA HirJM79 EN OTRAS BACTERIAS LÁCTICAS (BAL)	180
VII.3.2. CLONACIÓN Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA HirJM79 EN <i>Pichia pastoris</i>	184
VII.4. <i>Enterococcus faecalis</i> DBH18, AISLADO DE ÁNADES REALES (<i>Anas platyrhynchos</i>), CODIFICA LOS GENES <i>ef1097</i> Y <i>entL50A-entL50B</i>, RESPONSABLES DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS, Y UN GEN SIMILAR AL <i>entL50B</i> DENOMINADO <i>entJS</i>	187
VII.4.1. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA DE GENES DE <i>E. faecium</i> L50 y <i>E. faecalis</i> DBH18 PRODUCTORES DE BACTERIOCINAS	188
VII.4.2. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN SIMILAR AL <i>entL50B</i> Y DE LOS GENES ADYACENTES EN <i>E. faecalis</i> DBH18	189
VII.4.3. TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DEL GEN <i>entJS</i> DE <i>E. faecalis</i> DBH18	190
VII.4.4. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA JS (EntJS) POR <i>Pichia pastoris</i>	191
VII.4.5. PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS SOBRENADANTES DE <i>E. faecalis</i> DBH18 Y <i>E. faecium</i> L50	191
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES	
CHAPTER VIII. CONCLUSIONS	195
CAPÍTULO IX. TRABAJO FUTURO	201
CAPÍTULO X. BIBLIOGRAFÍA	207
APÉNDICE	243

RESUMEN



SUMMARY

Los enterococos constituyen un grupo microbiano de interés dentro de las bacterias lácticas (BAL) tanto en el campo de la alimentación como en el de la salud pública y el medio ambiente en los que colonizan numerosos nichos ecológicos debido a su elevada resistencia a condiciones ambientales adversas constituyendo una parte esencial de la microbiota intestinal de animales y personas aislándose, además, de muchos alimentos. Sin embargo, su presencia en los alimentos es controvertida ya que aunque destaca su papel en la conservación y desarrollo de las propiedades organolépticas de los alimentos fermentados y su actividad como probióticos, durante mucho tiempo los enterococos se han considerado como microorganismos indicadores de contaminación fecal y, recientemente, como responsables de enfermedades nosocomiales en pacientes sensibles como inmunodeprimidos, mujeres embarazadas, ancianos y niños. Dado que otra de las propiedades biotecnológicas de los enterococos radica en la producción de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) antagonistas del desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos, resulta aconsejable en los enterococos aislados de alimentos determinar la correlación entre su potencial higiénico (producción de bacteriocinas) y seguridad (factores de virulencia), así como evaluar aquellos nichos ecológicos alimentarios que faciliten el aislamiento de enterococos productores de bacteriocinas útiles como conservantes naturales de los alimentos o que puedan permitir su empleo como cultivos iniciadores, protectores o probióticos. En este sentido, los ánades reales (*Anas platyrhynchos*) se consideraron un nicho ecológico interesante para el aislamiento y caracterización de enterococos bacteriocinogénicos por su condición de especie de caza, acuática, desarrollada en medios de elevada contaminación química y bacteriológica, migratoria, ubícu y apta para el consumo humano.

Durante la primera parte de este trabajo del intestino y canales de ánades reales (*Anas platyrhynchos*) se aislaron, selectivamente, enterococos que se evaluaron por su actividad antimicrobiana, por la presencia de genes que codifican bacteriocinas y su expresión proteica, así como por la presencia de genes que codifican factores potenciales de virulencia. De los enterococos con actividad antimicrobiana, *Enterococcus faecalis* constituyó la especie mayoritaria, seguido de *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae* y de otros *Enterococcus* spp. Aunque los aislados de *E. faecalis* mostraron una potente actividad antimicrobiana directa no se detectó actividad antimicrobiana en la mayoría de sus sobrenadantes. Sin embargo, todos los *E. faecium* mostraron sobrenadantes con actividad antimicrobiana y codificaban genes productores de bacteriocinas, aunque la presencia en los aislados de genes responsables de la síntesis de bacteriocinas no siempre se correlaciona con una mayor actividad antimicrobiana de sus sobrenadantes. El gen *efaAfm* fue el único determinante de virulencia identificado en *E. faecium*, mientras los aislados de *E. faecalis* poseían un elevado número de factores de virulencia y los de *E. hirae* no mostraron ninguno de los determinantes de virulencia evaluados. Por ello, los aislados bacteriocinogénicos de *E. faecium* y *E. hirae* pueden considerarse higiénicos por su producción de enterocinas así como potencialmente seguros, debido a la baja o nula incidencia de genes que codifican factores potenciales de virulencia y a su susceptibilidad a la mayoría de los antibióticos de relevancia clínica. Sin embargo, la presencia en el intestino y canales de ánades reales de cepas de *E. faecalis* con una potente actividad antimicrobiana y múltiples factores de virulencia, acrecienta la preocupación por su posible patogenicidad para los consumidores. La amplificación por PCR de genes que codifican bacteriocinas, la utilización de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) adecuadas con anticuerpos policlonales de actividad predeterminada frente a diversas bacteriocinas, así como la adscripción de los aislados a diferentes grupos de inhibición, permitió el reconocimiento de aislados potencialmente

productores de nuevas bacteriocinas. De los microorganismos evaluados, *E. hirae* DCH5 y *Lactococcus garvieae* DCC43, aislados del contenido intestinal y de la canal de ánades reales, respectivamente, paren producir sustancia(s) antimicrobiana(s) no descrita(s). La purificación de la actividad antimicrobiana de *E. hirae* DCH5 y *L. garvieae* DCC43 mediante el empleo de soportes cromatográficos diversos, reveló un único fragmento peptídico tras su análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS), lo que sugiere que los péptidos antimicrobianos producidos se purificaron a homogeneidad.

Los resultados descritos sugieren que los ánades reales poseen en la canal y contenido intestinal una variada población de enterococos con actividad antimicrobiana, mediada por péptidos antimicrobianos o enterocinas previamente descritas o en evaluación, así como por compuestos de naturaleza todavía desconocida. Sin embargo, la existencia entre los enterococos de cepas de *E. faecalis* con una potente actividad antimicrobiana directa y múltiples determinantes de virulencia aumenta la preocupación en relación a su potencial patógeno en personas inmunodeprimidas, mujeres embarazadas, niños, ancianos o en aquéllas con enfermedades subyacentes. Por ello, sería de interés que los consumidores no ingieran alimentos con elevados niveles de enterococos con factores de virulencia. Por ello, desde un punto de vista higiénico y de seguridad alimentaria debería recomendarse la pronta evisceración y desplumado de los ánades reales y, seguramente, de otras piezas de caza menor abatidas. No obstante, los enterococos bacteriocinogénicos evaluados en este estudio podrían encontrar aplicaciones en la industria alimentaria como productores de péptidos antimicrobianos naturales, en la producción de ingredientes alimentarios con actividad antimicrobiana o para su empleo como cultivos iniciadores, protectores o probióticos, siempre que sus características higiénicas y de seguridad se evalúen con mayor profundidad.

A continuación se procedió a la determinación de la estructura primaria de la bacteriocina producida por *E. hirae* DCH5, aislado del intestino de ánades reales (*A. platyrhynchos*). La determinación, mediante degradación de Edman, de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina proporcionó una secuencia aminoacídica de 42 aminoácidos, lo que permitió el diseño de cebadores degenerados que se utilizaron para la amplificación, por técnicas de PCR inversa, de fragmentos génicos del gen estructural de la bacteriocina y de sus genes adyacentes. El análisis nucleotídico de un fragmento de 2.838-pb reveló la presencia de cinco marcos abiertos de lectura (ORFs). El primero de ellos (*hirJM79*) codifica un péptido de 74 aminoácidos con un péptido señal de 30 aminoácidos en su región N-terminal, seguido de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina madura, la hiracina JM79 (HirJM79), de 44 aminoácidos. El segundo (*hirJM79*) codifica la hipotética proteína de inmunidad de HirJM79. Los ORFs posteriores codifican una hipotética proteína de movilización (*orfC*), una relaxasa/nucleasa de movilización (*orfD*), y otra proteína hipotética (*orfE*), de secuencia incompleta. Experiencias de producción heteróloga de la HirJM79 en otras BAL indican que el gen *hirJM79* constituye el requerimiento mínimo para la producción de HirJM79 biológicamente activa, que la HirJM79 es secretada por la ruta general de secreción o sistema *sec*-dependiente, y que la HiriJM79 es, efectivamente, la proteína de inmunidad de la HirJM79. El sobrenadante libre de células de *E. hirae* DCH5 así como la bacteriocina purificada a homogeneidad se evaluaron por su actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos indicadores. Aunque la mayoría de los indicadores resultó sensible a su actividad antimicrobiana, la actividad antagonista de la bacteriocina purificada fue mayor, al igual que el número de microorganismos indicadores

sensibles. El incremento de la actividad antimicrobiana de la HirJM79 durante su purificación puede deberse a la reducción o eliminación de inhibidores, a la disminución en la formación de agregados que disminuyen su actividad o a modificaciones conformacionales hacia una forma más activa de la bacteriocina en el disolvente hidrofóbico. Aunque ninguna de las bacterias Gram-negativas evaluadas fue sensible a la actividad antimicrobiana de *E. hirae* DCH5, sin embargo, la bacteriocina producida por *E. hirae* DCH5 inhibe el desarrollo de bacterias patógenas y alterantes de los alimentos como *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. *E. hirae* DCH5 y su bacteriocina, HirJM79, son de interés biotecnológico como agentes antimicrobianos naturales en aplicaciones médicas y/o en alimentación humana y animal. Sin embargo, antes de progresar en sus posibles aplicaciones potenciales conviene evaluar otras características tecnológicas y de seguridad asociados tanto a la cepa descrita como a la bacteriocina identificada y caracterizada.

Ya que los enterococos se consideran involucrados en alteraciones alimentarias, infecciones nosocomiales y en la difusión de la resistencia a antibióticos, el interés en la producción heteróloga de enterocinas en otros hospedadores es cada vez mayor. Más aún, la producción heteróloga de bacteriocinas en otros hospedadores podría conducir a una mayor producción de las bacteriocinas, a su producción en hospedadores más seguros, a la obtención de cepas multibacteriocinogénicas de mayor actividad antimicrobiana y espectro de acción, y a la transferencia de actividad antimicrobiana a otras BAL útiles como cultivos iniciadores, protectores o probióticos. Por ello, en este trabajo se procedió a la clonación y producción heteróloga de la hiracina JM79, una bacteriocina Sec-dependiente producida por *E. hirae* DCH5, en otras bacterias lácticas (BAL) y en *Pichia pastoris*. Para la producción heteróloga de HirJM79 en otras bacterias lácticas (BAL) el gen estructural de la HirJM79 (*hirJM79*), con o sin su gen de inmunidad (*hiriJM79*), se clonó en el plásmido pMG36c bajo el control del promotor constitutivo P₃₂ y en el plásmido pNZ8048 con el promotor inducible P_{NisA}. Para la producción de HirJM79 en *P. pastoris* el gen que codifica la HirJM79 madura se clonó en el vector de expresión pPICZαA. Los plásmidos recombinantes permitieron la producción heteróloga de HirJM79 biológicamente activa en los sobrenadantes de *L. lactis* IL1403, *L. lactis* NZ9000, *Lb. sakei* Lb790, *E. faecalis* JH2-2 y *P. pastoris* X-33, la coproducción de HirJM79 y nisina A (NisA) en *L. lactis* DPC5598, y la coproducción de HirJM79 y enterocina P (EntP) en *E. faecium* L50/14-2. Las bacterias lácticas (BAL) recombinantes produjeron mayores cantidades de HirJM79 que *E. hirae* DCH5, aunque la actividad antimicrobiana de la mayoría de los transformantes fue menor que la esperada en base a su producción de HirJM79. No obstante, la síntesis, procesamiento y secreción de HirJM79 es eficaz tanto en las BAL evaluadas como en *P. pastoris*.

La elevada producción de HirJM79 por diversas BAL sugiere que el procesamiento y secreción de esta bacteriocina por la ruta general de secreción o sistema Sec-dependiente es eficaz en *L. lactis*, *Lb. sakei*, *E. faecium* y *E. faecalis*. Por ello, no se comprende bien como la mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL poseen un sistema dedicado de procesamiento y secreción cuando acceden al sistema Sec con un péptido señal (SP) adecuado. Las fusiones entre el SP_{HirJM79} y la secuencia madura de otras bacteriocinas puede permitir a las BAL sintetizar y producir bacteriocinas en ausencia proteínas específicas de procesamiento, secreción e inmunidad. La producción y actividad antimicrobiana de la HirJM79 por los cultivos de *P. pastoris* X-33TH puede facilitar futuras aplicaciones biotecnológicas de esta bacteriocina como péptido antimicrobiano natural en piensos para animales y en la industria alimentaria,

farmacéutica y veterinaria, así como en diversas aplicaciones médicas. Sin embargo, es conveniente considerar la optimización de la producción de esta bacteriocina por *P. pastoris* X-33TH, antes del diseño en gran escala de futuras aplicaciones de esta bacteriocina.

De interés en este trabajo ha sido observar que todos los *E. faecalis* aislados del intestino y canales de ánades reales codifican genes asociados a factores de virulencia y que todos, excepto *E. faecalis* DBH18, mostraron una potente actividad antimicrobiana directa mientras que, por el contrario, dicha actividad antimicrobiana no se detecta en sus sobrenadantes libres de células. Cuando el ADN genómico purificado de *E. faecalis* DBH18 se amplificó por PCR con cebadores derivados del gen *ef1097*, que codifica la enterocina V583 producida por *E. faecalis* V583 y con cebadores derivados de los genes *entL50A-entL50B* de *E. faecium* L50, productor de la enterocina L50 (EntL50A y EntL50B), la secuenciación nucleotídica de los fragmentos generados demostró que *E. faecalis* DBH18 codifica los genes *ef1097*, *entL50A-entL50B* y un gen similar al *entL50B*, denominado *entJS*. La secuencia nucleotídica de *entL50A-entL50B* fue idéntica en *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50, aunque por técnicas de PCR anidado se determinó que ambos genes podrían mostrar una localización diferente en dichos aislados. La secuenciación de fragmentos génicos de *E. faecalis* DBH18, conteniendo *entJS*, reveló la existencia de tres hipotéticos marcos de lectura abiertos (ORFs). El primero (*entJS*) codifica un péptido de 43 aminoácidos de una masa molecular teórica de 5.182,2 Da. El segundo (*orfB*) codifica un péptido de 89 aminoácidos de una masa molecular teórica de 10.636,2 Da y, el último (*orfC*) codifica otra proteína de 89 aminoácidos de una masa molecular teórica de 10.552,8 Da. La evaluación de la actividad antimicrobiana del producto del gen *entJS* (EntJS) obtenido mediante experiencias de transcripción/traslación *in vitro*, así como mediante su producción heteróloga en *Pichia pastoris*, sugieren que *entJS* es responsable de la producción y expresión funcional del péptido antimicrobiano enterocina JS (EntJS).

Los resultados descritos sugieren que *E. faecalis* DBH18 codifica múltiples bacteriocinas cuya secuencia nucleotídica y actividad antimicrobiana puede no limitarse a especies determinadas de enterococos ni al origen alimentario, clínico o ambiental de los enterococos que las codifican. Dichos resultados también confirman que la producción de múltiples bacteriocinas se encuentra extendida en los enterococos. No obstante, ya que *E. faecalis* DBH18 codifica factores potenciales de virulencia conviene considerar su potencial patogenicidad en personas inmunodeprimidas o con enfermedades subyacentes. Sin embargo, las enterocinas producidas por *E. faecalis* DBH18 pueden encontrar aplicaciones como péptidos antimicrobianos naturales en la industria alimentaria, farmacéutica y veterinaria, así como en diversas aplicaciones médicas. El desarrollo de experiencias que determinen la regulación, procesamiento, secreción y producción de la bacteriocina Sec-dependiente EntV583 y de las enterocinas EntL50A, EntL50B y EntJS producidas por *E. faecalis* DBH18 también se considera de gran interés científico y aplicado en microbiología de los alimentos, en salud pública y en el área de trabajo de las bacteriocinas.

Enterococci are lactic acid bacteria (LAB) of importance in environmental, food and public health. They are widespread in nature inhabiting a great variety of ecological niches due to their high tolerance to adverse environmental conditions and constitute an essential part of the native gut microbiota of humans and animals and a normal part of the food microflora. Enterococci display desirable properties such as the ability to produce antimicrobial substances like bacteriocins which may inhibit food-spoilage and food-borne pathogenic bacteria, while others emphasize their significance to preserve and develop flavour in fermented food, and their benefits as probiotics. However, their presence in food is controversial: some authors consider them undesirable as being indicators of faecal contamination and responsible of food spoilage, while others emphasize their emergence as an important cause of nosocomial infections specially in immunocompromised patients. Accordingly, it would be of great interest to evaluate the hygienic (bacteriocin production) and safety aspects (virulence factors) related to enterococci isolated from ecological niches that could facilitate the isolation of bacteriocinogenic strains potentially useful as starter, protective and probiotic cultures. The mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) constitute an interesting ecological niche for the isolation and characterization of bacteriocinogenic enterococci due to their growth and survival in highly contaminated waters, migratory activities, ubiquity, and availability through hunting for human consumption.

Accordingly, samples from the intestinal content and carcasses of mallard ducks (*A. platyrhynchos*) were evaluated for enterococci with antimicrobial activity, presence of genes coding bacteriocins and their expression, and potential virulence factors. *Enterococcus faecalis* comprised the largest enterococcal species with antagonistic activity followed by *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, and *Enterococcus* spp. PCR-amplification of genes coding bacteriocins and determination of their nucleotide sequence, and the use of specific anti-peptide bacteriocin antibodies and a non-competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA), permitted characterization of enterococci coding described bacteriocins and their expression. Although all *E. faecalis* isolates manifested a potent direct antimicrobial activity, no activity was detected in supernatants of most producer cultures. However, all *E. faecium* isolates showed antimicrobial activity in their supernatants and encoded bacteriocins, although the occurrence in the isolates of several enterocin genes did not always correlate with a higher antagonistic activity in supernatants. The *efaAfm* determinant was the only virulence gene detected in *E. faecium*, while *E. faecalis* showed a larger number of virulence determinants, and *E. hirae* did not carry any of the virulence genes examined. On the other hand, the rapid identification of genes coding described bacteriocins permits recognition of isolates that are potentially producers of novel bacteriocins. From the isolates evaluated, *E. hirae* DCH5 and *Lactococcus garvieae* DCC43 may be producers of a non-yet described antimicrobial substance(s). Purification of the antimicrobial activity of *E. hirae* DCH5 and *L. garvieae* DCC43 to homogeneity revealed unique chromatographic fragments after MALDI-TOF mass spectrometry analysis, suggesting the antagonistic peptides were purified to homogeneity.

Mallard ducks hold in their intestinal content and carcasses a diverse enterococcal population with antimicrobial activity. Bacteriocinogenic *E. faecium* and *E. hirae* isolates may be considered hygienic due to production of enterocins, and potentially safe for their low incidence of potential virulence genes and susceptibility to most clinically relevant antibiotics. However, the presence among the enterococci of *E. faecalis* strains with a potent antagonistic activity and multiple virulence factors, gives the enterococci a possible concern regarding their potential pathogenicity

for immunocompromised persons. In the sake of a good microbiological practice, it should be proposed not to feed the consumer with high levels of virulence factor-loaded enterococci. Accordingly, it should be recommended that mallards and other small game be eviscerated and defeathered longer before consumption. Nevertheless, some of the antagonistic enterococci and their enterocins evaluated in this study may find potential applications in the food and feed industry as producers of natural antimicrobial compounds, for production of food ingredients with antimicrobial activity, and for their evaluation as protective cultures and/or probiotics, provided their hygienic and safety status is further evaluated.

In this work the primary structure of a bacteriocin produced by *E. hirae* DCH5 was determined by combined amino acid and DNA sequencing. The primary structure of a bacteriocin, produced by *E. hirae* DCH5, was determined by combined amino acid and DNA sequencing. Nucleotide analysis of a 2,838-bp DNA fragment of *E. hirae* DCH5 revealed five putative open reading frames (ORFs). The first *orf* (*hirJM79*) encodes a 74-amino-acid peptide containing an N-terminal signal peptide of 30 amino acids, followed by the amino acid sequence of the mature bacteriocin, hiracin JM79 (HirJM79), of 44 amino acids. The second *orf* (*hiriJM79*) encodes the putative immunity protein of HirJM79. Contiguous ORFs encode a putative mobilization protein (*orfC*), a relaxase/mobilization nuclease domain (*orfD*), and an hypothetical protein (*orfE*) of incomplete sequence. The production and functional expression of HirJM79 by heterologous hosts suggest that *hirJM79* is the minimum requirement for production of biologically active HirJM79, that HirJM79 is most likely externalized by the general secretory pathway or Sec-dependent pathway, and that HiriJM79 is the immunity protein for HirJM79. The increase in the antimicrobial activity of HirJM79 during its purification may be the result of removal of antimicrobial inhibitors, disaggregation of the bacteriocin or conformational change to a more active form of the bacteriocin in the hydrophobic solvent. *E. hirae* DCH5 and its bacteriocin, HirJM79, might have biotechnological interest as natural antimicrobial agents in medical applications and/or in the food and feed industry. However, before an evaluation of their potential applications, other safety and/or technological characteristics of this strain, and its bacteriocin, would be investigated.

Since enterococci are involved in food spoilage, nosocomial infections, and spread of antibiotic resistance, interest in the heterologous production and functional expression of enterocins in other microbial hosts is growing rapidly. Moreover, production of enterocins in other hosts could lead to increased bacteriocin production, production of bacteriocins in safer hosts, obtention of multibacteriocinogenic strains with wider antimicrobial spectrum, and transfer of antimicrobial capabilities to LAB that are useful as starter, protective, and probiotic cultures. In this work, hiracin JM79 (HirJM79), a Sec-dependent bacteriocin produced by *E. hirae* DCH5, was cloned and produced in *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, *E. faecium*, *E. faecalis*, and *Pichia pastoris*. For heterologous production of HirJM79 in lactic acid bacteria (LAB) the HirJM79 structural gene (*hirJM79*), with or without the HirJM79 immunity gene (*hiriJM79*), was cloned in plasmid pMG36c under control of the constitutive promoter P₃₂, and in plasmid pNZ8048 under control of the inducible P_{NisA} promoter. For production of HirJM79 in *P. pastoris*, the gene encoding the mature HirJM79 was cloned into the pPICZαA expression vector. The recombinant plasmids permitted the production of biologically active HirJM79 in the supernatants of *L. lactis* IL1403, *L. lactis* NZ9000, *Lb. sakei* 790, *E. faecalis* JH2-2, and *P. pastoris* X-33, the coproduction of HirJM79 and nisin A (NisA) in *L. lactis* DPC5598, and the coproduction of HirJM79 and enterocin P (EntP) in *E. faecium* L50/14-2. All recombinant LAB produced larger quantities of

HirJM79 than *E. hirae* DCH5, although the antimicrobial activity of most transformants was lower than predicted from their production of HirJM79. The synthesis, processing, and secretion of HirJM79 proceeds efficiently in the recombinant LAB strains and *P. pastoris*.

The high-level production of HirJM79 by LAB hosts suggests that production of this bacteriocin by the Sec pathway is efficient in *L. lactis*, *Lb. sakei*, *E. faecium*, and *E. faecalis*. It remains unclear why most LAB bacteriocins have a dedicated processing and secretion system when they can access the Sec pathway if provided with an appropriate signal peptide. Fusions between the SP^{HirJM79} and the mature part of other bacteriocins may allow LAB strains to secrete bacteriocins in the absence of specific immunity and secretion proteins. The production and antimicrobial activity of HirJM79 in the supernatants of *P. pastoris* X-33TH may facilitate future biotechnological applications of this bacteriocin as a natural antimicrobial peptide in food, pharmaceutical, veterinary, and medical applications. However, before large-scale applications of this bacteriocin further strategies for optimal production of HirJM79 by the *P. pastoris* hosts should be developed.

Relevant to this work was the observation that all *E. faecalis* isolates carried virulence-associated genes and that all, except *E. faecalis* DBH18, showed a potent direct antimicrobial activity, while no antagonistic activity was detected in their supernatants. Purified genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 was PCR-amplified with primers derived from *ef1097*, encoding the enterococcin V583 produced by *E. faecalis* V583, and from *entL50A-entL50B* of *Enterococcus faecium* L50, producer of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B). Nucleotide sequencing of the amplified fragments indicates that *E. faecalis* DBH18 encodes *ef1097*, *entL50A-entL50B* and an *entL50B*-like gene, termed *entJS*. The *entL50A-entL50B* sequence was identical in *E. faecalis* DBH18 and in *E. faecium* L50, although nested PCR results suggest that these genes in *E. faecalis* DBH18 may be located in a different genetic locus than in *E. faecium* L50. Further sequencing of fragments containing *entJS* from *E. faecalis* DBH18 revealed three putative open reading frames (ORFs). The first *orf* (*entJS*) encodes a predicted 43-amino-acid peptide of 5,182.2 Da, the second (*orfB*) encodes a predicted 89-amino-acid protein of 10,636.2 Da, and the third (*orfC*) encodes a predicted 89-amino-acid protein of 10,552.8 Da. The evaluation of the antimicrobial activity of the *entJS* gene product obtained by an *in vitro* combined transcription/translation assay and its heterologous production by *Pichia pastoris*, suggest that *entJS* is the only requirement for production and biological expression of the antimicrobial peptide enterocin JS (EntJS).

The results described suggest that *E. faecalis* DBH18 encodes multiple bacteriocins whose nucleotide sequence and antimicrobial activity may not be limited to defined enterococcal species nor to the food, clinical or environmental origin of the enterococcal strains. This also confirms that production of multiple bacteriocins seems to be a common feature of enterococci. However, since *E. faecalis* DBH18 also encodes potential virulence factors this microorganism is of possible concern regarding its potential pathogenicity to persons with underlying diseases or an impaired immune system. Nevertheless, most of the enterocins produced by *E. faecalis* DBH18 may find potential applications as natural antimicrobial agents in food, feed, pharmaceutical, veterinary, and medical applications. Further efforts to evaluate the production, regulation, immunity, secretion, and mobilization of the Sec-dependent EntV583 and the leaderless EntL50A, EntL50B, and EntJS bacteriocins produced by *E. faecalis* DBH18, constitutes an attractive scientific challenge in food microbiology, public health, and the bacteriocin-research field.

CAPÍTULO I
EXPOSICIÓN GENERAL DEL
PROBLEMA A INVESTIGAR Y
DE LOS OBJETIVOS DEL
TRABAJO DE
INVESTIGACIÓN

*CHAPTER I
GENERAL ACCOUNT OF
THE OBJECTIVES AND AIMS
OF THE RESEARCH
PROBLEM*

Las bacterias ácido-lácticas o bacterias lácticas (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de bacterias Gram-positivas, entre las que se incluyen las del género *Enterococcus*. El hábitat natural de los enterococos es el tracto gastrointestinal del hombre y los animales, por lo que se consideran como indicadores de contaminación fecal. No obstante, los enterococos también se aíslan del agua, suelo, vegetales, insectos, etc. y su ubicuidad resulta de su elevada resistencia a diversas condiciones adversas (pH, temperatura, salinidad, etc.). Los enterococos también se aíslan de alimentos fermentados donde favorecen el desarrollo de sus características organolépticas y contribuyen a la mejora de su calidad higiénica mediante procesos de antagonismo bacteriano, entre los que se incluyen la competencia por nutrientes del sustrato y la síntesis y secreción de péptidos con actividad antimicrobiana, como las bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal, con o sin modificaciones post-traduccionales y que, en ocasiones, manifiestan una potente actividad antagonista y un amplio espectro de acción frente a microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*. Sin embargo, el potencial biotecnológico de los enterococos en la industria alimentaria se encuentra cuestionado ya que pueden poseer genes que codifican factores potenciales de virulencia y de resistencia a antibióticos de relevancia en terapia humana y de ocasionar infecciones nosocomiales graves en pacientes sensibles. Por ello, la seguridad de los alimentos asociados a la presencia de enterococos es una cuestión que la industria alimentaria debería abordar detenidamente.

Teniendo en cuenta lo descrito previamente, conviene determinar en los enterococos la correlación entre su potencial higiénico (producción de bacteriocinas) y seguridad (factores de virulencia), así como evaluar aquellos nichos ecológicos alimentarios que faciliten el aislamiento de enterococos productores de bacteriocinas útiles como conservantes naturales de los alimentos o que puedan ser empleados como cultivos iniciadores, protectores o probióticos de los alimentos. En este contexto, los animales de caza menor abatidos en cacerías y destinados al consumo humano constituyen un nicho ecológico relevante para el aislamiento de enterococos bacteriocinogénicos y la posterior evaluación de su potencial higiénico y seguridad. Por ello, los ánades reales (*Anas platyrhynchos*) constituyen una especie de caza menor interesante para el estudio de los enterococos presentes tanto en su contenido intestinal como en su canal, debido a su condición de especie salvaje, acuática, migratoria, ubicua y apta para el consumo humano, que habita ambientes con una elevada carga microbiana, de dieta prácticamente omnívora y distribución mundial.

Por otra parte, las bacteriocinas sintetizadas por los enterococos, denominadas enterocinas, podrían mostrar su utilidad como "bioconservadores" o "bioconservantes" de los alimentos debido a su capacidad de eliminar, reducir o controlar el desarrollo de microorganismos alterantes de los alimentos o de aquéllos productores de toxiinfecciones alimentarias (TIA), reduciendo de esta forma el empleo de aditivos químicos, así como la intensidad de los tratamientos tecnológicos que influyen negativamente en su calidad organoléptica y/o nutricional. Las bacteriocinas podrían emplearse en los alimentos: (a) como aditivos o péptidos antimicrobianos naturales; (b) como productos derivados de la fermentación de sustratos alimentarios con un microorganismo bacteriocinogénico (ingrediente alimentario); (c) inoculando el microorganismo bacteriocinogénico u otro más adaptado al sustrato alimenticio que exprese heterológicamente la(s) bacteriocina(s) de interés, como cultivos iniciadores, protectores y probióticos de los alimentos; y (d) como aceleradores de la maduración de los alimentos

fermentados, mediante la lisis de cultivos iniciadores productores de enzimas líticos, proteinasas y lipasas.

Con la situación legislativa actual, el empleo de bacteriocinas en los alimentos recaerá en el uso de microorganismos bacteriocinogénicos como cultivos iniciadores, protectores o probióticos en aquellos productos fermentados que permitan un desarrollo microbiano adecuado o en la utilización de las bacteriocinas como ingredientes antimicrobianos de alimentos no fermentados. Sin embargo, el empleo de los enterococos bacteriocinogénicos como cultivos iniciadores, protectores o probióticos de los alimentos se encuentra sometido a un intenso debate científico por su consideración de microorganismos indicadores de contaminación fecal y por la producción de posibles factores de virulencia. Además, el empleo de las enterocinas, producidas por enterococos, como ingredientes alimentarios plantea el problema de la presencia en sus sobrenadantes de posibles factores de virulencia, lo que ratifica la conveniencia de determinar en los enterococos la correlación entre su potencial higiénico (producción de bacteriocinas) y seguridad (factores de virulencia). Por la misma razón, también se considera conveniente el desarrollo de estrategias de clonación y producción de las bacteriocinas de mayor interés en hospedadores que actúen como "factorías" celulares de producción de bacteriocinas, lo que permitiría alcanzar los siguientes objetivos: (a) ampliar el espectro antimicrobiano de las BAL; (b) que las BAL utilizadas como cultivos iniciadores adaptados a diversos alimentos (leche, carne, encurtidos, etc.) produzcan bacteriocinas producidas por bacterias lácticas de otro origen; (c) permitir la producción de varias bacteriocinas por un sólo microorganismo hospedador; (d) producir las bacteriocinas en mayores cantidades que en los microorganismos de dónde proceden; y (e) obtenerlas de los sobrenadantes de microorganismos considerados como seguros (GRAS, del inglés "*Generally Recognized as Safe*") o calificados como presuntamente seguros (QPS, del inglés "*Qualified Presumption of Safety*") para su uso en la industria alimentaria.

La mayoría de las bacteriocinas producidas por las BAL se sintetizan como precursores inactivos con una extensión N-terminal del tipo doble-glicina (secuencia líder) que es procesada conjuntamente con su secreción a través de la membrana citoplásmica por transportadores-ABC (del inglés "*ATP-binding cassette transporters*") dedicados y proteínas accesorias, lo que constituye un sistema de transporte dedicado (DTS, del inglés "*Dedicated Transport System*"). Dichas bacteriocinas poseen el gen estructural, el de inmunidad y los genes que codifican el transportador-ABC y proteínas accesorias en un único operón, aunque en ocasiones pueden estar situados en un operón distinto al del gen estructural. Además, en algunos casos, bien en el mismo operón o en otro contiguo, se localizan los genes que codifican un sistema regulador de dos o tres componentes responsable de la regulación de la síntesis de la bacteriocina madura. Sin embargo, otras bacteriocinas poseen extensiones N-terminales del tipo Sec (péptido señal), que funcionan como señales de reconocimiento proteolítico y son procesadas, conjuntamente con la externalización de la bacteriocina madura, por un sistema Sec o ruta general de secreción (GSP, del inglés "*General Secretory Pathway*") o sistema Sec-dependiente. A diferencia de las bacteriocinas procesadas y secretadas por un sistema de transporte dedicado (DTS), las bacteriocinas que utilizan la ruta general de secreción (GSP) no requieren proteínas involucradas específicamente en su procesamiento, transporte y secreción. Por ello, el desarrollo de estrategias de clonación, producción y expresión funcional de bacteriocinas con una extensión N-terminal del tipo "péptido señal", puede constituir una alternativa molecular sencilla, segura y

eficaz de producción de bacteriocinas de interés en BAL de interés en la industria alimentaria. Otras bacteriocinas se sintetizan sin una extensión N-terminal y, seguramente, representan péptidos antimicrobianos con un sistema novedoso de procesado, transporte y secreción.

Por consiguiente, los objetivos de este trabajo de investigación han sido los siguientes:

- (1). Evaluación de la presencia y expresión de genes estructurales que codifican bacteriocinas y factores potenciales de virulencia en enterococos aislados de ánades reales (*Anas platyrhynchos*).
- (2). Purificación a homogeneidad y determinación de la secuencia aminoacídica y nucleotídica de la hiracina JM79 (HirJM79) producida por *Enterococcus hirae* DCH5 y de los marcos abiertos de lectura (ORFs, del inglés "Open Reading Frames") adyacentes.
- (3). Clonación, producción y expresión funcional de la HirJM79 en diversos hospedadores, incluyendo otras BAL y la levadura *Pichia pastoris*.
- (4). Determinación de la presencia y expresión de genes que codifican bacteriocinas en *Enterococcus faecalis* DBH18, un aislado que codifica múltiples factores potenciales de virulencia y manifiesta una elevada actividad antimicrobiana de sus sobrenadantes, frente a microorganismos alterantes y patógenos de interés en la industria alimentaria.
- (5). Determinación de la secuencia nucleotídica y expresión funcional de los genes de *E. faecalis* DBH18 presuntamente asociados a la producción de bacteriocinas.

Sin embargo, para lograr los objetivos propuestos fue necesario desarrollar el siguiente trabajo de investigación:

- (1). Aislamiento de enterococos del intestino y canales de ánades reales (*Anas platyrhynchos*) y evaluación de su actividad antimicrobiana directa frente a diversos microorganismos indicadores.
- (2). Identificación y filiación taxonómica de los aislados bacteriocinogénicos seleccionados previamente y determinación de la presencia de genes estructurales que codifican bacteriocinas y factores potenciales de virulencia.
- (3). Detección y cuantificación de la producción de bacteriocinas en los enterococos que las codifican, mediante el empleo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) y de anticuerpos de especificidad predeterminada frente a las bacteriocinas de interés.
- (4). Purificación a homogeneidad de una bacteriocina de *E. hirae* DCH5 y determinación de su masa molecular, secuencia aminoacídica y secuencia nucleotídica. Obtención de anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada frente a la HirJM79.

- (5). Clonación, producción y expresión funcional de la HirJM79 en *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000, *L. lactis* subesp. *lactis* DPC5598, *Lactobacillus sakei* 790, *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* L50/14-2 y *Pichia pastoris*.
- (6). Amplificación por PCR (del inglés, "*Polymerase Chain Reaction*") de ADN genómico purificado de *E. faecalis* DBH18, empleando cebadores diseñados de los genes *ef1097* de *E. faecalis* V583 y *entL50AB* de *E. faecium* L50 y secuenciación nucleotídica de los fragmentos resultantes.
- (7). Análisis genético y funcional de la enterocina JS (EntJS) producida por *E. faecalis* DBH18. Determinación de la secuencia nucleotídica del gen *entJS* y de otros adyacentes. Utilización de técnicas de PCR-anidado que permiten la localización parcial de los genes *entL50AB* en *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50.

The lactic acid bacteria (LAB) constitute a heterogeneous group of Gram-positive bacteria in which the *genus Enterococcus* is included. The enterococci are regular inhabitants of the intestine constituting an essential part of the endogenous gut microbiota of humans and animals, and thus they are considered as indicators of faecal contamination. However, microorganisms of the *genus Enterococcus* are also isolated from surface waters, soil, plants, insects, etc. Enterococci are widespread in nature because their ability to survive to adverse environmental conditions such extreme pH, temperatures and salinity, withstanding conditions of food preservation. The enterococci are also isolated from fermented foods, where most of the times they can positively contribute to the organoleptic characteristics of the final food. Moreover, enterococci contribute to the hygienic quality of food throughout competition for nutrients and the production of antimicrobial peptides like bacteriocins. Bacteriocins are considered as ribosomally synthesized antimicrobial peptides, with or without posttranslational modifications and, in some cases, with a strong antagonistic activity and a wide inhibitory spectrum against spoilage and foodborne pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Clostridium botulinum*. However, the biotechnological potential of the enterococci in the food industry remains questioned since some of them encode potential virulence factors and resistance to clinically relevant antibiotics. They are also able to cause serious nosocomial infections in sensitive hospitalized patients. Accordingly, the safety of foods containing enterococci is an issue that the food industry must carefully address.

Therefore, it would be of great interest to evaluate the hygienic (antimicrobial activity) and safety aspects (virulence factors) associated to enterococci of food origin, as well as the evaluation of those ecological niches that permits the isolation of bacteriocinogenic enterococci potentially useful as producers of natural antimicrobial peptides or as starter, protective, and probiotic cultures. Wild animal species profitable for human consumption and available from hunting constitute an important ecological niche for the isolation of bacteriocinogenic enterococci and the evaluation of their hygienic and safety aspects. In Spain, birds and other small game animal species may be commercialized and reach the consumers noneviscerated, nonskinned, and nondefeathered. The Mallard duck (*Anas platyrhynchos*) is a migratory waterfowl, ubiquitous, omnivorous, and profitable for human consumption, which lives in heavily contaminated microbial environments.

On the other hand, the bacteriocins synthesized by enterococci, referred to as enterocins, could prove useful as food biopreservatives due to their capacity to eliminate, reduce or control the development of spoilage and/or foodborne pathogens. The use of bacteriocins as natural antimicrobial agents may also reduce the use of chemical additives, as well as the intensity of technological treatments which could have a negative impact on the nutritional and/or sensorial quality of food. Bacteriocins could be used in food: (a) as natural antimicrobial peptides or additives; (b) as a fermented substrate by a bacteriocinogenic producer with antimicrobial activity (food ingredient); (c) inoculating the foods with the bacteriocinogenic microorganism or a better adapted host for heterologous production of the bacteriocin(s) as starter, protective and probiotic cultures; and (d) as accelerators of the ripening of fermented foods through the bacteriolysis of highly proteolytic and/or lipolytic starter cultures.

Taking into account the actual legislation, the application of bacteriocins in foods would be based in the use of starters, protective, and probiotic microorganisms producers of bacteriocins in

substrates that permit growth of the producer organisms, or in the use of the bacteriocins as food ingredients in non-fermented foods. However, the use of bacteriocinogenic enterococci as starter, protective and probiotic cultures is subjected to an intense scientific debate due to their consideration of indicators of faecal contamination and the production of potential virulence factors. Moreover, the use of the enterocins produced by enterococci as food ingredients raise the problem of the possible presence of potential virulence factors in their preparations, supporting the interest to evaluate the correlation between the hygienic (antimicrobial activity) and safety aspects (virulence factors) of the bacteriocinogenic enterococci of interest. Of great interest is also the development of strategies for the cloning, heterologous production and functional expression of bacteriocins in other hosts that may behave as “cellular factories” for increased bacteriocin production, production of bacteriocins in safer hosts, obtention of multibacteriocinogenic strains with wider antimicrobial spectrum, and transfer of antimicrobial capabilities to LAB that are useful as starter, protective, and probiotic cultures in food.

Most of the bacteriocins produced by LAB are synthesized as inactive precursors with an N-terminal extension of the so-called double-glycine type (leader sequence) which is recognized and processed by dedicated ATP-binding cassette transporters (ABC-transporters) that permits the processing, transport and secretion of the mature bacteriocin to the extracellular environment. Besides of the structural and immunity gene, bacteriocins secreted by dedicated transport systems (DTS) hold in their operon genes encoding an ABC-transporter and an accessory protein. Furthermore, some of the bacteriocin-encoding operons may even hold a regulatory system of two or three components, for regulation of synthesis and production of mature bacteriocins. However, a reduced number of bacteriocins are synthesized with an N-terminal extension of the Sec-type (signal peptide), which are proteolytically cleaved concomitantly with bacteriocin externalization by the general secretory pathway (GSP) or Sec-dependent pathway of the host. These antimicrobial peptides (Sec-dependent bacteriocins) do not require the presence of dedicated genes encoding proteins for their processing, transport and secretion. Therefore, the development of strategies for the cloning, production, and functional expression of bacteriocins synthesized with an N-terminal extension of the so-called signal peptide (SP) and secreted by the host general secretory pathway (GSP), may constitute an easy and efficient procedure for the heterologous production and functional expression of bacteriocins in appropriate bacterial hosts.

Accordingly, have been the objectives of this research proposal the following:

- (1). Evaluation of genes encoding bacteriocins and their expression, as well as the presence of potential virulence factors in enterococci isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*).
- (2). Purification to homogeneity of the antimicrobial peptide produced by *Enterococcus hirae* DCH5, and determination of the amino acid and nucleotide sequence and adjacent genes of hiracin JM79 (HirJM79), a novel Sec-dependent bacteriocin.
- (3). Cloning and heterologous production of hiracin JM79 (HirJM79), a Sec-dependent bacteriocin produced by *E. hirae* DCH5, in Lactic Acid Bacteria (LAB) and *Pichia pastoris*.
- (4). Genetic analysis of gene-encoding bacteriocins present in *Enterococcus faecalis* DBH18, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*).

However, to reach the proposed objectives it was necessary to develop the following research work:

- (1). Selection of enterococci from the intestinal content and carcasses of Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*), and evaluation of their direct antimicrobial activity against selected indicator microorganisms.
- (2). Identification and partial taxonomic characterization of the bacteriocinogenic isolates, and evaluation of the presence of structural genes encoding described bacteriocins and potential virulence factors.
- (3). Evaluation in the enterococci of interest of the production of known bacteriocins by the use of specific antipeptide bacteriocin antibodies and a noncompetitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA).
- (4). Purification to homogeneity of an antimicrobial peptide produced by *E. hirae* DCH5 and determination of its amino acid and nucleotide sequence. Generation and evaluation of antipeptide-specific anti-HirJM79 polyclonal antibodies.
- (5). Construction of recombinant plasmids, using different expression vectors, for heterologous production and functional expression of HirJM79 in *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000, *L. lactis* subesp. *lactis* DPC5598, *Lactobacillus sakei* 790, *Enterococcus faecalis* JH2-2, *Enterococcus faecium* L50/14-2, and *Pichia pastoris*.
- (6). PCR-amplifications of purified genomic DNA from *Enterococcus faecalis* DBH18, with primers designed from the gene encoding the enterococcin V583 from *E. faecalis* V583, and the *entL50AB* genes of *E. faecium* L50, producer of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), and nucleotide sequencing of the resulting PCR-amplified fragments.
- (7). Genetic and functional analysis of enterocin JS (EntJS) produced by *Enterococcus faecalis* DBH18. Determination of the nucleotide sequence of gene *entJS* and adjacent genes. Construction of recombinant plasmids, using different expression vectors, for the *in vitro* combined transcription/translation of an *entL50B*-like gene (*entJS*) and heterologous production and functional expression of enterocin JS (EntJS) in *Pichia pastoris*. Nested PCR amplification of genomic DNA to determine the location of the genes *entL50AB* in *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN GENERAL

técnicas de clasificación, a sus características genéticas y a estudios serológicos, los estreptococos fecales o del grupo D de Lancefield se han subdividido en tres géneros filogenéticamente distintos: *Streptococcus sensu stricto*, *Lactococcus* y *Enterococcus* (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984; Devriese y col., 1993; Devriese y Pot, 1995). Las especies patógenas, con la excepción de *Streptococcus thermophilus*, se mantuvieron dentro del género *Streptococcus*, siendo así separadas de las especies no patógenas y de interés en la industria alimentaria, que se incluyeron en el nuevo género *Lactococcus*. Los estreptococos fecales del tracto gastrointestinal de humanos y animales, de diversos alimentos fermentados y de otros nichos ecológicos constituyeron el nuevo género *Enterococcus* (Casaus, 1998; Franz y col., 2003). Filogenéticamente los enterococos se incluyen dentro del grupo "Clostridial", de las bacterias Gram-positivas junto con otras BAL de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. De todos ellos, los géneros *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* son los más parecidos filogenéticamente a los enterococos (Casaus, 1998; Franz y col., 1999a; Gutiérrez, 2005).

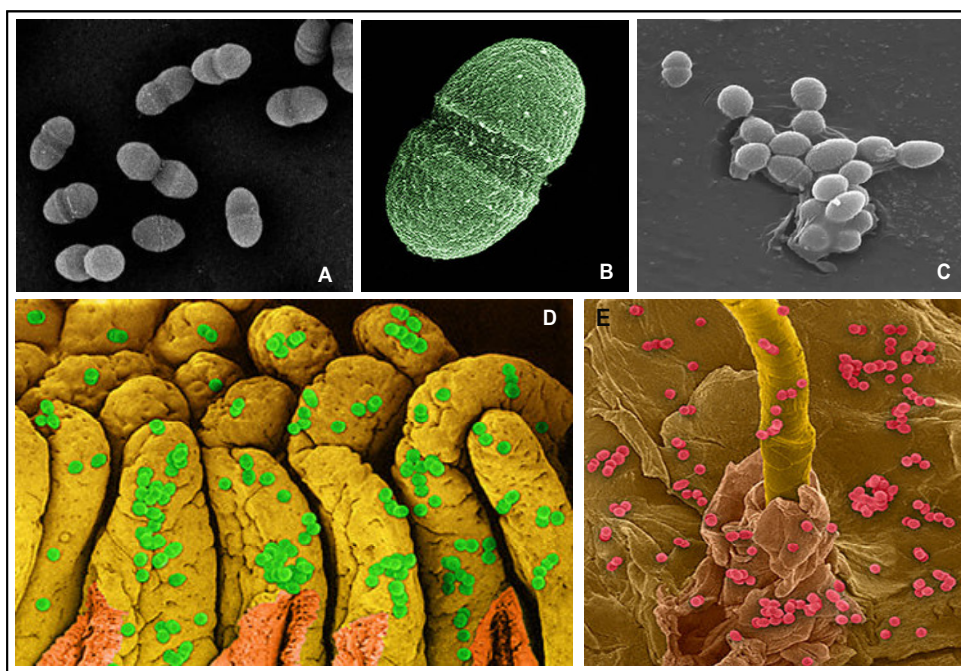


Figura 2.2. Imágenes de *Enterococcus* spp obtenidas por microscopía electrónica. (A) *Enterococcus faecium*. (B) y (C) *Enterococcus faecalis*. (D) *E. faecium* en la superficie del intestino delgado. (E) *E. faecium* en la superficie de piel y folículo piloso humano.

El género *Enterococcus* engloba microorganismos Gram-positivos de morfología cocoide, catalasa negativos, inmóviles, anaerobios facultativos y no formadores de esporas ni cápsulas. Entre las características fisiológicas que distinguen al género se encuentran su capacidad de desarrollarse entre 10 y 45°C, en caldo de cultivo con un 6,5% (p/v) de cloruro sódico, en un rango de pH de entre 4,6 y 9,6-10, en presencia de un 40% de sales biliares y en medios con un 0,04% (p/v) de azida de sodio (Franz y col., 2003; Martínez, 2003). Sin embargo, algunas especies del género *Enterococcus* no manifiestan todas las características diferenciales. Éste es el caso de, entre otros, *E. dispar* y *E. sulfureus* que no se desarrollan a temperaturas de 45°C mientras que *E. cecorum* y *E. columbae* no lo hacen a 10°C; por otra parte, estas últimas,

además de *E. avium* y de otras especies relacionadas, manifiestan un crecimiento muy lento en presencia de un 6,5% de cloruro sódico. Por lo que respecta a las pruebas serológicas, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. pseudoavium*, *E. sulfureus* y *E. saccharolyticus* no poseen el antígeno D de Lancefield (Casaus, 1998; Domig y col., 2003; Franz y col., 2003). Además, no existe una característica de entre las mencionadas que sea única para este género, pudiendo haber cepas de otros géneros cercanos como por ejemplo *Streptococcus* y *Lactococcus* que muestren una o más de las características típicas del género *Enterococcus* (Ruoff, 1990).

En base a estudios comparativos de la fracción 16S del ARNr, las 25 especies que actualmente constituyen el género *Enterococcus* se distribuyen en los siguientes grupos (Franz y col., 2003):

- Grupo *E. faecium*: *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. porcinus*, *E. villorum* y *E. azikeevi*.
- Grupo *E. avium*: *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium* y *E. raffinosus*.
- Grupo *E. gallinarum*: *E. casseliflavus*, *E. flavescens* y *E. gallinarum*.
- Grupo *E. dispar*: *E. asini* y *E. dispar*.
- Grupo *E. saccharolyticus*: *E. sulfureus* y *E. saccharolyticus*.
- Grupo *E. cecorum*: *E. columbae* y *E. cecorum*.
- Grupo *E. faecalis*: *E. faecalis*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis* y *E. rottiae*.
- Tetragenococcus*: *E. solitarius*, *Tetragenococcus halophilus* y *Tetragenococcus muriaticus*.

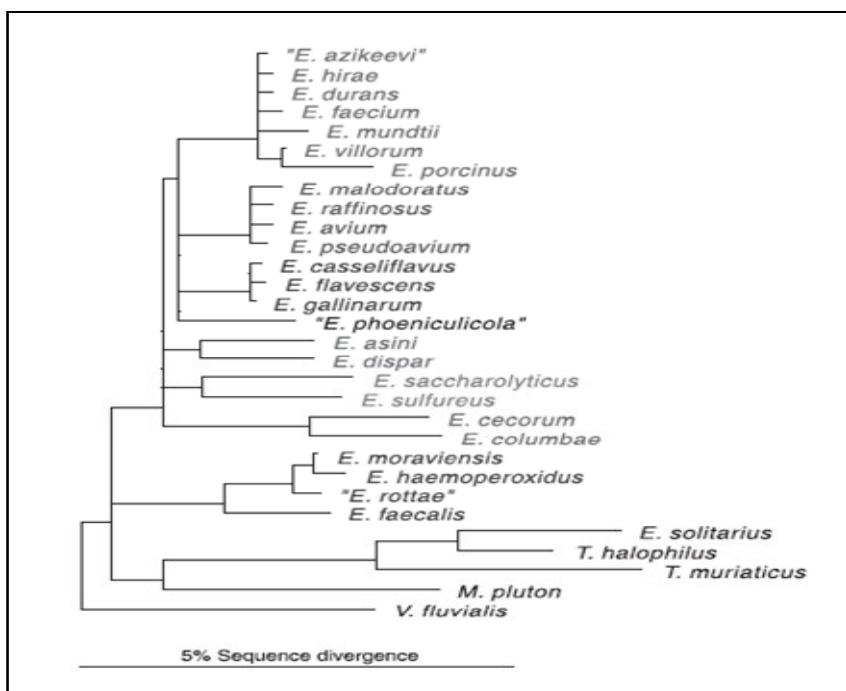


Figura 2.3. Árbol filogenético basado en estudios comparativos de la fracción 16S del ARNr de diferentes especies de *Enterococos*. La longitud de la barra indica un 5% de divergencia estimada en la secuencia. Fuente: Franz y col. (2003).

Asimismo, en los últimos años se han propuesto nuevas especies de enterococos, todas ellas aisladas de diversos nichos ecológicos y caracterizadas mediante el empleo de diversas técnicas analíticas como hibridación DNA-DNA, secuenciación de la fracción 16S del ARNr y del ADNr,

análisis de perfiles de proteínas totales por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), tests fisiológicos convencionales, etc. Así, se han propuesto recientemente especies como *E. caccae* (Carvalho y col., 2006), *E. silesiacus* y *E. termitis* (Svec y col., 2006), *E. aquimarinus* (Svec y col., 2005a), *E. devriesei* (Svec y col., 2005b), *E. canintestini* (Naser y col., 2005), *E. saccharominimus* (Vancanneyt, 2004), *E. hermanniensis* (Koort y col., 2004), *E. italicus* (Fortina y col., 2004), *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E1, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E2 y *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E3 (Carvalho y col., 2004), *E. canis* (De Graef y col., 2003), *E. phoeniculicola* (Law-Brown y Meyers, 2003), *E. gilvus* y *E. pallens* (Tyrrell y col., 2002), y *E. porcinus* y *E. ratti* (Teixeira y col., 2001). Por tanto, el género *Enterococcus* ha experimentado en los últimos años importantes cambios en su taxonomía y, debido a la heterogeneidad del grupo, a la variabilidad de sus características típicas y al desarrollo de nuevas técnicas analíticas, probablemente seguirá experimentándolos en años venideros.

Los enterococos son microorganismos ubicuos que constituyen una parte importante de la flora gastrointestinal del hombre y de los animales (Murray, 1990). Una vez han alcanzado el medio ambiente a través de las heces, pueden colonizar una gran variedad de ecosistemas debido a su gran capacidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas (pH, temperatura, salinidad). Por tanto, no solamente se encuentran asociados al tracto gastrointestinal de animales y personas, sino que se hallan también en el suelo, agua, plantas, insectos y alimentos (Casaus, 1998; Franz y col. 1999a; Giraffa, 2003; Gutiérrez, 2005). Los enterococos colonizan los alimentos por contaminaciones ambientales o desde el tracto gastrointestinal y posteriormente se desarrollan en los mismos sobreviviendo a las condiciones habituales de su producción en la industria alimentaria (Giraffa, 2003). Entre las más de 20 especies de *Enterococcus* reconocidas hasta el momento, *E. faecium* y *E. faecalis* son las que más frecuentemente se aíslan del tracto gastrointestinal de los mamíferos y de una gran variedad de alimentos, principalmente de los de origen animal como la leche y productos lácteos y los embutidos crudos curados (Herranz, 2000; Giraffa, 2003). La presencia de enterococos en los alimentos es, en muchas ocasiones, beneficiosa desde un punto de vista tecnológico y de seguridad alimentaria. Se ha comprobado que los enterococos mejoran características sensoriales como el aroma y el sabor de los alimentos fermentados (Sarantinopoulos y col., 2001) contribuyendo, en ocasiones, a la obtención de productos únicos desde el punto de vista organoléptico (Franz y col., 2003). Por otra parte, los enterococos también se han empleado como cultivos iniciadores, especialmente en productos tradicionales y artesanales en los que la fermentación se realiza por la flora endógena del alimento (Hugas y col., 2003), y como probióticos tanto para personas como animales (Bellomo y col., 1980; Owings y col., 1990; Fukata y col., 1991; Franz y col., 1999a; Martínez, 2003). Además, algunos enterococos de origen alimentario producen bacteriocinas antagonistas del desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos (Henderson y col., 1992; Cintas y col., 1997; Mendoza y col., 1999; Kawamoto y col., 2002; Berjeaud y Cenatiempo, 2004), eliminando o reduciendo su presencia y, mejorando, de este modo, la seguridad de los mismos.

No obstante, conviene también saber que los enterococos son considerados como indicadores de contaminación fecal, son microorganismos alterantes de los alimentos, producen aminas biógenas (Hugas y col., 2003) y, lo más preocupante, se consideran patógenos oportunistas responsables de infecciones nosocomiales, especialmente en pacientes

inmunodeprimidos o con enfermedades subyacentes (Franz y col., 2003; Foulquié-moreno y col., 2006). Diversas cepas de *E. faecalis* y, en menor proporción, de *E. faecium* se han aislado de bacteriemias, infecciones del tracto genitourinario, endocarditis y de otras infecciones tanto en personas como animales (Kayser, 2003; MacEachern y col., 2005), mientras que cepas de *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii* y *E. durans* se han asociado a endoftalmitis y endocarditis en personas (Dargere y col., 2002; Poyart y col., 2002; Stepanovic y col., 2004; Higashide y col., 2005). Todo esto, unido a la presencia en algunas especies de enterococos de genes que codifican factores potenciales de virulencia (Franz y col., 2001; Eaton y Gasson, 2001; Martín y col., 2006) y de resistencia a antibióticos (Morrison y col., 1997; Haas y col., 2002; Shankar y col., 2002), cuestiona su presencia en los alimentos. Debido a este carácter dual de los enterococos, su uso como cultivos iniciadores, protectores o probióticos ha sido objeto de debate en los últimos años. Por ello, es muy conveniente una evaluación previa y meticulosa de la posible existencia de factores de virulencia y de resistencia a antibióticos en aquellas cepas de enterococos que pueden ser utilizadas en la industria alimentaria, seleccionando únicamente aquellas que no posean factores potenciales de virulencia y sean sensibles a la mayoría de los antibióticos de relevancia clínica (Franz y col., 2003; Kayser, 2003).

II.1.3. ASPECTOS FUNCIONALES DE LOS ENTEROCOCOS

II.1.3.1. Concepto de bioconservante de los alimentos

Debido a su metabolismo, las bacterias lácticas desempeñan un papel importante en la obtención de alimentos fermentados de origen cárnico, lácteo y vegetal. Las actividades metabólicas de las BAL modifican la textura, aroma, sabor, color, digestibilidad y palatabilidad de las materias primas, originando productos finales de características organolépticas diferentes y deseables (Cintas y col., 2000b). Además de un papel tecnológico, las BAL también desempeñan una función higiénica en los alimentos, debido a su competencia por los nutrientes del sustrato y a la producción de metabolitos como el ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina y diversas bacteriocinas que inhiben el desarrollo de bacterias alterantes y patógenas potencialmente presentes en los alimentos (Cintas y col., 2001; Gutiérrez, 2005; Citti, 2005).

Para alcanzar los niveles de seguridad, calidad higiénica y durabilidad de los alimentos exigidos tanto por el consumidor como por el propio mercado, éstos se someten a complejos procesos tecnológicos y a la incorporación, de muy diversas formas, de aditivos químicos. Sin embargo, cada vez es mayor el número de consumidores que demandan productos más “naturales”, con un tratamiento industrial menos severo y libres de aditivos artificiales. Por ello, se ha sugerido que la industria alimentaria debería promover el empleo de “bioconservantes” o “bioconservadores” (Cleveland y col., 2001; O'Sullivan y col., 2002; Devlieghere y col., 2004) que, formando parte de un sistema de barreras múltiples, garanticen la seguridad y la calidad higiénica de los alimentos que consumimos. El término “bioconservante” o “bioconservador” engloba a un grupo de compuestos antimicrobianos naturales de origen animal, vegetal o microbiano, que no parecen poseer un efecto perjudicial en la salud de los consumidores y que permiten incrementar la calidad higiénica, seguridad y vida útil de los alimentos. De los compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas, las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente (Cintas y Casaus, 1998; Gutiérrez, 2005) poseyendo, en general,

características que favorecen su empleo como “bioconservantes” en la industria alimentaria (O’Sullivan y col., 2002; Gutiérrez, 2005) como son las siguientes:

- (1). Muchas bacteriocinas son producidas por bacterias reconocidas como seguras (GRAS, del inglés "*Generally Recognized As Safe*"), como las bacteriocinas producidas por BAL de los géneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*.
- (2). Son de naturaleza proteica, lo que permite su degradación por enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal evitando efectos adversos en el consumidor como disbiosis intestinales o fenómenos alérgicos.
- (3). Ausencia de actividad frente a células eucariotas.
- (4). La mayoría son resistentes a los tratamientos tecnológicos empleados en la conservación de los alimentos como la pasteurización, la liofilización o la acidificación.

A su vez, las bacteriocinas podrían emplearse en los alimentos siguiendo las siguientes estrategias: (a) inoculación del microorganismo bacteriocinogénico y producción de la bacteriocina *in situ*; (b) empleo como ingrediente alimentario de un medio fermentado por una cepa bacteriocinogénica y (c) empleo como aditivo antimicrobiano de la bacteriocina purificada o parcialmente purificada del sobrenadante de la cepa productora (Aymerich y Hugas, 1998; Ross y col., 1999; Hugas y col., 2003; Foulquié Moreno y col., 2006). Actualmente, la utilización de la nisina como aditivo alimentario (E-234 en la Unión Europea) está legalizada en más de 50 países para su empleo como aditivo antimicrobiano en quesos, derivados lácteos, alimentos enlatados y alimentos infantiles (Cintas y col., 2000b; O’Sullivan y col., 2002; Riley y Wertz, 2002). Sin embargo, puesto que la mayoría de las BAL se consideran microorganismos GRAS, la producción *in situ* de las bacteriocinas en los alimentos constituye una alternativa de uso interesante. Además, se ha comprobado que, en algunos casos, las BAL productoras de bacteriocinas pueden mejorar el sabor y la calidad de alimentos fermentados mediante el control que ejercen sobre la proliferación de poblaciones bacterianas no deseables y su acción como agentes inductores de lisis celular incrementando la tasa de proteólisis (O’Sullivan y col., 2002). No obstante, la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas en los alimentos puede verse afectada por una serie de factores, entre los que destacan (Herranz, 2000; Hugas y col., 2003):

- (1). Incapacidad de la cepa productora de producir suficiente cantidad de bacteriocina en el alimento.
- (2). Inactivación de la bacteriocina por componentes del alimento como enzimas proteolíticas o por su unión a macromoléculas.
- (3). Inestabilidad de la bacteriocina en el alimento.
- (4). Desarrollo de microorganismos resistentes a la bacteriocina.

También se han propuesto otras estrategias que permitan el empleo en los alimentos de bacteriocinas producidas por microorganismos considerados no seguros, como por ejemplo, la producción heteróloga y expresión funcional de los genes implicados en la síntesis de una o varias bacteriocinas en microorganismos considerados seguros y, en muchos casos, utilizados como cultivos iniciadores en los alimentos. De esta manera, podrían obtenerse microorganismos considerados seguros que produjeran una combinación “a la carta” de varias bacteriocinas (co-

producción), ampliando su espectro de acción frente aquellos microorganismos cuya proliferación se desee inhibir o disminuir y reduciendo la posible aparición de poblaciones bacterianas resistentes a las bacteriocinas.

Asimismo, el uso de las bacteriocinas para impedir la proliferación de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos y aumentar su vida útil conviene contemplarlo dentro de un sistema de barreras múltiples en combinación con otros tratamientos tecnológicos subletales. Así, la combinación del uso de bacteriocinas con otros sistemas de conservación de los alimentos puede constituir un sistema eficaz para obtener alimentos más seguros y duraderos, disminuyendo las concentraciones usuales de aditivos químicos y la intensidad de los tratamientos tecnológicos necesarias para inhibir el desarrollo de microorganismos alterantes o patógenos potencialmente presentes en los alimentos (Hugas y col., 2003; Devlieghere y col., 2004; Citti, 2005; Gutiérrez, 2005).

II.1.3.2. Bacteriocinas de las bacterias lácticas

II.1.3.2.1. Definición y clasificación

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por bacterias que se secretan al medio exocelular con o sin modificaciones postraduccionales (Klaenhammer, 1993; Jack y col., 1995; Nes y col., 1996). Igualmente, las bacteriocinas se engloban dentro de un grupo más amplio y heterogéneo de péptidos antimicrobianos producidos por numerosas formas de vida diferentes, desde insectos a mamíferos, pasando por las plantas, bacterias y hongos, y que constituyen una de las más antiguas estrategias antimicrobianas de los organismos vivos formando parte de su sistema inmunológico innato (Cotter y col., 2005a). En general, las bacteriocinas son péptidos de pequeño tamaño molecular, de naturaleza catiónica y anfipática, capaces de desestabilizar la membrana citoplasmática de las células sensibles (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Diep y Nes, 2002; Riley y Wertz, 2002; Gutiérrez, 2005). Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas, como las colicinas de *Escherichia coli*, son péptidos con un tamaño molecular superior a 20 kDa y un reducido espectro de actividad antimicrobiana. Por el contrario, las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas son, generalmente, péptidos de tamaño molecular inferior a 6 kDa y de un mayor espectro de acción, aunque con grandes variaciones (Nissen-Meyer y Nes, 1997).

Debido a la continua aparición de nuevas bacteriocinas, a la constante ampliación de los conocimientos que se tiene sobre ellas y a la heterogeneidad del grupo en cuanto a su tamaño molecular, modo de acción, propiedades bioquímicas, espectro de acción y organización genética, se han propuesto a lo largo de los años diversas formas de clasificación atendiendo a características comunes que permiten agruparlas en clases. Para la escritura de esta memoria se ha elegido la clasificación propuesta por Cotter y col., (2005a) por su sencillez y relativa actualidad. En ella, se divide las bacteriocinas en las siguientes clases y subclases (Tabla II.1):

- (1) Clase I: bacteriocinas que contienen aminoácidos modificados o lantibióticos. Son bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<5 kDa) y termoestables, cuya característica principal es la presencia de aminoácidos modificados postraduccionalmente como la deshidroalanina (Dha) y deshidrobutirina (Dhb),

originados por deshidratación de la serina y la treonina, respectivamente. La lantionina (Lan) y β -metil-lantionina (MeLan) proceden de reacciones de condensación de la Dha o Dhb respectivamente, con el grupo sulfhidrido de las cisteínas (McAuliffe y col., 2001; Bauer y Dicks, 2005). A su vez, en función de su estructura y modo de acción los antibióticos se subdividen en: (a) antibióticos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana formando poros y cuyo prototipo es la nisina, y (b) antibióticos globulares, aniónicos o neutros, inmunológicamente activos y que actúan como inhibidores enzimáticos (Jung, 1991). En cualquier caso, independientemente de su consideración como antibióticos simples o de aquellos cuya actividad resulta de la acción de dos péptidos, su compleja estructura hace que sea un grupo cuya clasificación resulta complicada; de hecho, recientemente se ha propuesto su división en 11 subgrupos basándose en la secuencia de los pre-péptidos sin modificar (Cotter y col., 2005b).

- (2) Clase II: bacteriocinas que no contienen lantioninas ni otros aminoácidos modificados postraduccionalmente. Son péptidos de pequeño tamaño molecular (<10 kDa), termorresistentes, hidrófobos, catiónicos y que, generalmente, actúan induciendo la permeabilización de la membrana citoplasmática, con la consiguiente fuga o pérdida de moléculas desde el citosol de la bacteria diana. A su vez, las bacteriocinas de la clase II se subdividen como: clase IIa, bacteriocinas similares a las pediocinas (“pediocin-like”) con marcada actividad antilisteria que poseen una región conservada (aunque con variaciones) en el extremo N-terminal, también denominada “pediocin box”; clase IIb, bacteriocinas cuya actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos, siendo éste un grupo heterogéneo; clase IIc, bacteriocinas que presentan una estructura cíclica como consecuencia de que los extremos N-terminal y C-terminal están unidos por un enlace covalente, y que podría subdividirse a su vez en la subclases IIc(i) y IIc(ii) en base al porcentaje de identidad de sus secuencias aminoacídicas; y, por último, la clase IId, bacteriocinas lineales que comprenden aquellas no incluidas en los grupos anteriores. Otros investigadores han propuesto, asimismo, la subdivisión de la clase IIa en las subclases IIa.1, IIa.2 y IIa.3, en base a la similitud de su región aminoacídica C-terminal (Fimland y col., 2005; Johnsen y col., 2005a), y la subdivisión de la clase IId en función de la naturaleza de su extensión N-terminal (Diep y Nes, 2002).
- (3) Bacteriolisinas: proteínas bacteriolíticas de elevado tamaño molecular (>30 kDa), termolábiles y con un mecanismo de acción diferente al de las bacteriocinas, ya que actúa directamente sobre la pared celular de las bacterias Gram-positivas sensibles lisándolas.

Recientemente, un nuevo esquema de clasificación agrupa a las bacteriocinas producidas por enterococos, reconocidas como enterocinas, en enterocinas de la clase I (antibióticos), clase II (no antibióticos), clase III (cíclicas) y clase IV (proteínas). A su vez, la clase II se subdivide en la clase II.1 (enterocinas similares a las pediocinas), clase II.2 (enterocinas sin extensión N-terminal) y clase II.3 (enterocinas no similares a las pediocinas) (Franz y col., 2007).

II.1.3.2.2. *Propiedades físico-químicas*

La mayoría de las bacteriocinas de las clases I y II son péptidos de pequeño tamaño y de bajo peso molecular (>10 kDa), catiónicos a pH 7, poseen un elevado punto isoeléctrico y

contienen regiones hidrofóbicas e hidrofílicas en su molécula relacionadas con su actividad sobre la membrana plasmática de las células sensibles (Citti, 2005). La naturaleza catiónica de las moléculas permite su unión a los fosfolípidos de carga neta negativa de la membrana citoplasmática de las células sensibles, y su carácter anfipático favorece su distribución en la misma y la formación de poros (Diep y Nes, 2002; Gutiérrez, 2005). Otras características como su termoestabilidad, naturaleza proteica y resistencia a condiciones extremas de pH y salinidad, hacen que las bacteriocinas de las clases I y II sean de gran interés por su posible aplicación como bioconservantes de los alimentos. Además, debido a su naturaleza proteica, las bacteriocinas serían inactivadas por enzimas proteolíticos de origen gástrico (pepsina) y pancreático (tripsina y quimiotripsina), por lo que su empleo como bioconservantes alimentarios no modificaría la ecología microbiana del tracto digestivo de los consumidores (Herranz, 2000).

Tabla II.1. Esquema de la clasificación propuesta para las bacteriocinas

Classification	Remarks/suggestions	Examples
Class I		
Lanthionine-containing bacteriocins/lantibiotics	Includes both single- and two-peptide lantibiotics; up to 11 subclasses have been proposed	Single-peptide: nisin, mersacidin, lactacin 481; two-peptide: lactacin 3147, cytolysin
Class II		
Non-lanthionine-containing bacteriocins	Heterogeneous class of small peptides; includes pediocin-like (subclass a bacteriocins), two-peptide (subclass b bacteriocins), cyclic (subclass c; formerly class V), non-pediocin single linear peptides (subclass d)	Class IIa: pediocin PA1, leucocin A; class IIb: lactacin F; class IIc: enterocin AS48, reuterin 6; class IId: lactococcin A, divergicin A
Bacteriolysins		
Non-bacteriocin lytic proteins	Large, heat-labile proteins, often murein hydrolases	Lysostaphin, enterolysin A

Fuente: Cotter y col. (2005a).

II.1.3.2.3. Purificación de las bacteriocinas

Con el tiempo se han desarrollado diversos protocolos de purificación de las bacteriocinas con el fin de obtener mejores rendimientos y reducir, de este modo, los costes de obtención de bacteriocinas purificadas para su posterior empleo como aditivos antimicrobianos naturales de los alimentos. Como las bacteriocinas son péptidos que se liberan al medio extracelular, la mayor parte de los protocolos de purificación comienzan con una etapa de concentración de la bacteriocina presente en el sobrenadante libre de células de la cepa productora. Seguidamente se recurre al empleo de diversas técnicas cromatográficas de separación, basadas en las propiedades físico-químicas de las bacteriocinas y cuyo objetivo es la separación de la bacteriocina del resto de proteínas de la muestra (Martínez y col., 2000b; Cintas y col., 2001). Sin embargo, el rendimiento obtenido con muchos de estos protocolos de purificación es, por lo general, más bien bajo. Por ello, aunque son válidos para su aplicación en el laboratorio, su escaso rendimiento, el elevado coste de los soportes cromatográficos y reactivos empleados y la escasa cantidad de bacteriocina purificada obtenida, hacen que su aplicación a gran escala en la industria alimentaria sea problemática. Debido a esto, una buena opción para potenciar el uso de las bacteriocinas como bioconservadores sería desarrollar y optimizar protocolos de purificación de las diferentes bacteriocinas de interés para reducir los costes de dichos protocolos e incrementar las cantidades de bacteriocina purificada obtenida, haciendo posible su producción a gran escala de forma rentable y su uso comercial. Asimismo, la utilización de anticuerpos

específicos de actividad predeterminada frente a las bacteriocinas también permite su purificación de los sobrenadantes de las cepas productoras mediante el empleo de técnicas de inmunocromatografía de afinidad, como se ha demostrado con la purificación de las bacteriocinas nisina A (Suárez y col., 1997), pediocina PA-1 (Martínez, 2000), enterocina B (Rose y col., 2001), divercina V41 (Richard y col., 2003) y enterocina P (Gutiérrez y col., 2004). Las matrices de inmuoafinidad permiten, además, la purificación de las bacteriocinas en un sólo paso y con un rendimiento superior al de los métodos multi-cromatográficos convencionales. No obstante, la utilización de soportes cromatográficos de inmuoafinidad es una técnica cara y su eficacia disminuye rápidamente tras la reutilización continuada de las columnas cromatográficas de inmuoafinidad.

II.1.3.2.4. Espectro de acción antimicrobiana

Generalmente, las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas, como las colicinas producidas por *E. coli*, presentan un reducido espectro de actividad antimicrobiana afectando únicamente a bacterias relacionadas filogenéticamente con la productora. Sin embargo, las bacteriocinas producidas por BAL, entre las que se encuentran las enterocinas, presentan por lo general un espectro de actividad más amplio, aunque con grandes variaciones, y son activas fundamentalmente frente a bacterias Gram-positivas (Jack y col., 1995). Asimismo, con relación a la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de la clase I y II (Jack y col., 1995) pueden realizarse las siguientes observaciones: (i) dentro de una misma especie pueden existir cepas sensibles o resistentes a una misma bacteriocina; (ii) dentro de una población de células sensibles a una bacteriocina pueden existir células resistentes; (iii) una cepa sensible a una bacteriocina puede ser resistente a otra bacteriocina similar; (iv) los esporos bacterianos resistentes a una bacteriocina procedentes de células vegetativas sensibles a dicha bacteriocina se hacen sensibles a ésta tras la germinación, y (v) en condiciones normales las bacteriocinas producidas por BAL no son activas frente a bacterias Gram-negativas, mohos y levaduras debido a que la estructura y composición de su pared celular impide el acceso de las bacteriocinas a su lugar de acción, las membranas plasmáticas. No obstante, bajo circunstancias que debiliten su pared celular como, por ejemplo, tratamientos con agentes químicos (ácidos orgánicos y EDTA), calentamiento moderado, congelación o la utilización de presiones hidrostáticas elevadas, los microorganismos sometidos a dichos tratamientos pueden resultar sensibles a la acción antimicrobiana de las bacteriocinas (Cintas y col., 2001; Arqués y col., 2003).

La heterogeneidad del espectro de acción antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por las BAL, permite el establecimiento de tres grupos de actividad (Cintas y col., 2001):

- (1). Espectro de acción reducido: bacteriocinas únicamente activas frente a cepas de la misma especie o frente a especies del mismo género.
- (2). Espectro de acción intermedio: bacteriocinas que inhiben a otras BAL distintas al microorganismo productor y a otras bacterias Gram-positivas, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *C. botulinum*.
- (3). Espectro de acción amplio: bacteriocinas que, además de las especies mencionadas anteriormente, inhiben a otras como *Propionibacterium* spp. y *Bacillus* spp.

II.1.3.2.5. *Modo de acción*

Las bacteriocinas pueden ejercer sobre las células sensibles un efecto bactericida o bacteriostático dependiendo de diversos factores como son: (i) la dosis y el grado de purificación de la bacteriocina; (ii) el estado fisiológico de las células sensibles; y (iii) las condiciones ambientales, entre las que destacan la temperatura, el pH o la presencia de agentes u otros compuestos antimicrobianos que debiliten la pared o membrana celular de las células sensibles (Cintas y col., 2001). Las bacteriocinas ejercen su acción antimicrobiana generalmente mediante la desestabilización funcional de la membrana citoplasmática de las células sensibles a través de un proceso que se desarrolla en tres fases (Jack y col., 1995; Moll y col., 1999) (Fig. 2.4):

- (1). Unión a la membrana: las bacteriocinas se unen a la membrana a través de interacciones electrostáticas establecidas entre los residuos de las bacteriocinas cargados positivamente y los grupos negativos de los fosfolípidos de la membrana (Fig. 2.4 A).
- (2). Inserción en la membrana: la naturaleza anfipática de las bacteriocinas facilita su distribución a lo largo de la membrana, adoptando conformaciones en hélice α o en lámina β , que favorecen la subsiguiente formación de poros (Herranz, 2000; Gutiérrez, 2005) (Fig. 2.4 B).
- (3). Formación de poros y la consiguiente desestabilización funcional de la membrana (Fig. 2.4 C y D).

Actualmente existen dos modelos que explican el mecanismo por el que las bacteriocinas forman poros en las membranas citoplasmáticas (Moll y col., 1999):

- (a) Modelo “cuña”: la bacteriocina se sitúa paralelamente a la membrana empujando las cabezas polares de los fosfolípidos hacia los lados, la membrana adelgaza y el péptido adopta una orientación transmembrana y agrega con otros péptidos, formando un poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio). La nisina y otros lantibióticos emplean este modelo de actividad (Fig. 2.4D).
- (b) Modelo “duela de barril”: los péptidos se insertan en la membrana para, posteriormente, reclutar péptidos adicionales y formar agregados proteicos (al unirse con otras moléculas de bacteriocina) que resultan en la formación del poro (Fig. 2.4C). Las caras hidrofílicas se dirigen hacia la luz del poro mientras que las superficies hidrofóbicas interaccionan con el núcleo hidrofóbico de la membrana. Este modelo de actividad es aplicable a la mayoría de las bacteriocinas de la clase II.

La formación de estos poros origina un flujo pasivo de moléculas de pequeño tamaño a través de la bicapa lipídica (iones, aminoácidos, ATP) con la consecuente disipación de la fuerza protón motriz (PMF, del inglés “*Proton Motive Force*”) o de algunos de sus componentes (potencial de membrana y/o gradiente de pH). La PMF es un gradiente electroquímico esencial en las células para el desarrollo de procesos metabólicos dependientes de energía, como el transporte de nutrientes y la síntesis de macromoléculas, por ejemplo proteínas y ácidos nucleicos. Todo este proceso resulta finalmente en el cese del desarrollo y en la muerte de las células sensibles (Herranz, 2000; Citti, 2005).

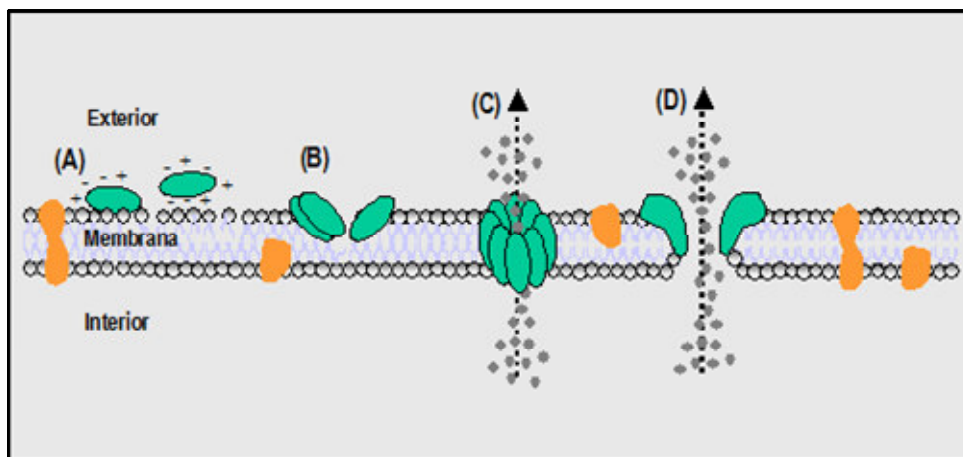


Figura 2.4. Mecanismo de acción de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Las fases principales del mecanismo de acción de las bacteriocinas son: unión a la membrana mediante interacciones electrostáticas (A), inserción en la misma (B), y la formación de poros que pueden ser de dos tipos: en forma de rueda de barril (C) o en forma de cuña (D). Fuente: Martínez (2000).

Sin embargo, algunas bacteriocinas de la clase I (lantibióticos) como la nisina, presentan un modo de acción dual que se desencadena una vez unida la bacteriocina a un receptor de membrana. Este receptor de membrana suele ser la proteína lípido II, el principal transportador de peptidoglicanos desde el citoplasma hasta la pared celular (Wiedemann y col., 2001, 2004; Hsu y col., 2004). Una vez establecida dicha unión, por un lado impide la correcta formación o síntesis de la pared celular pudiendo provocar *per se* la muerte de la bacteria diana, y por otro, la propia bacteriocina emplea dicha proteína transportadora como molécula de anclaje para iniciar el proceso de inserción en la membrana y la subsiguiente formación del poro, produciendo también de esta manera la muerte de la bacteria diana. Otros lantibióticos, como la mersacidina, parecen presentar únicamente el mecanismo de unión al lípido II y la consiguiente inhibición de la síntesis de pared celular, pero no el mecanismo de formación de poros (Cotter y col., 2005a).

Debido al amplio espectro de acción de algunas bacteriocinas, la existencia en las células sensibles de receptores proteicos específicos para las bacteriocinas podría parecer poco probable. También se cree que las diferencias en el espectro de acción de bacteriocinas con estructuras primarias similares no pueden depender exclusivamente de las interacciones entre un péptido catiónico y los fosfolípidos de la membrana celular, lo que sugiere que diferencias muy sutiles en la estructura de los péptidos pueden originar diferencias notables en su especificidad (Eijsink y col, 1998; Fimland y col., 1998). No en vano, con la excepción de la nisina y unos pocos lantibióticos muy similares, los mecanismos mediante los cuales las bacteriocinas reconocen específicamente sus células dianas no son bien conocidos, así como los mecanismos de inmunidad. No obstante, estudios recientes (Diep y col., 2007) apuntan a que la lactococina A y varias bacteriocinas de la clase II podrían usar componentes del sistema de la manosa-fosfotransferasa (Man-PTS, del inglés "*mannose phosphotransferase system*") como receptores específicos de las células diana, y que sus proteínas de inmunidad podrían actuar también a este nivel. En bacterias, el sistema Man-PTS constituye la ruta clave el transporte de la manosa al interior celular, aunque también puede aceptar la glucosa como sustrato. La entrada de los carbohidratos al citoplasma celular se realiza junto a su fosforilación mediante una serie de reacciones mediadas por las proteínas EI, Hpr, IIB, IIC y IID (Postma y col., 1993). Las proteínas EI y Hpr intervienen de forma inespecífica en diferentes sistemas fosfotransferasas

(PTS), mientras que las proteínas IIA_B, IIC y IID intervienen únicamente en el sistema Man-PTS. Las proteínas IIC y IID forman un complejo localizado en la membrana, mientras que la proteína IIA_B se sitúa en el citoplasma pudiendo establecer contactos reversibles con dicho complejo (Fig. 2.5) (Mao y col., 1995). Según este modelo, la bacteriocina emplea las proteínas IIC y IID del sistema Man-PTS como receptor en las células diana (Fig. 2.5.1 y 2.5.2). La unión de la bacteriocina a dichas proteínas desencadena, de alguna manera, la permeabilización de la membrana (Fig. 2.5.3), causando la pérdida de componentes celulares y, finalmente, la muerte celular. Aunque la naturaleza exacta de los poros se desconoce, parece lógico pensar que se formen bien por agregación de moléculas de bacteriocina, o bien por la disrupción del sistema Man-PTS. En células inmunes no productoras de bacteriocina, la proteína de inmunidad (I) no se encuentra estrechamente asociada con el sistema Man-PTS (Fig. 2.5.1'). Únicamente cuando se añade bacteriocina exógena al medio de cultivo (Fig. 2.5.2'), la proteína de inmunidad se aproxima y se une fuertemente a las proteínas diana (IIC y IID). De este modo, las células están protegidas, probablemente por el bloqueo de las moléculas de bacteriocina, impidiendo que se activen las subsiguientes fases que conducen a la muerte celular (Fig. 2.5.3'). En células productoras de bacteriocina, la proteína de inmunidad está estrechamente asociada a las proteínas receptoras de la bacteriocina, protegiendo así a las células (Fig. 2.5.3'). En todos los casos, el componente citoplásmico IIA_B puede establecer contactos con los componentes de membrana (IIC y IID) sin verse implicado en función de receptor (Fig. 2.5).

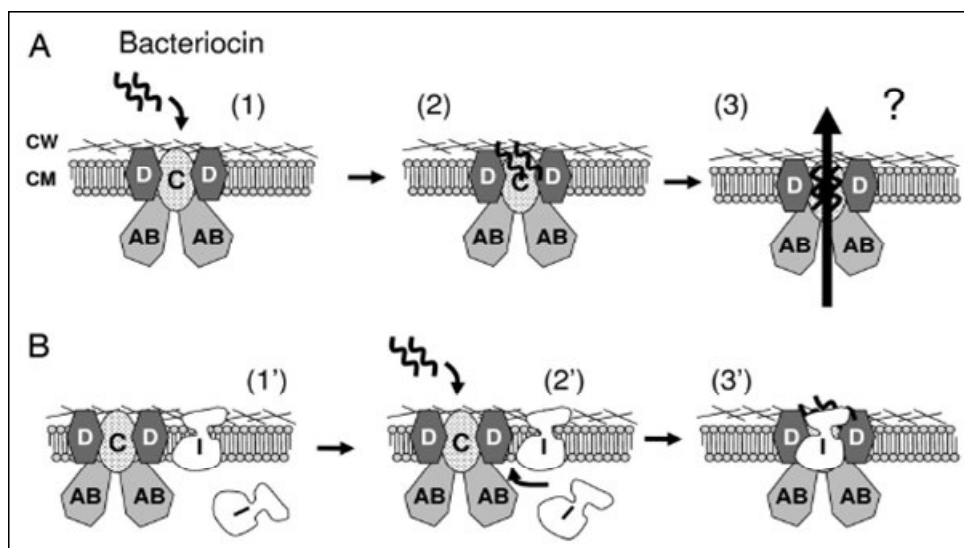


Figura 2.5. Modelo de destrucción de células diana y mecanismo de inmunidad frente a la lactococina A y probablemente para otras bacteriocinas similares a las pediocinas. CW, pared celular; CM, membrana citoplásmica. La funcionalidad del modelo se describe en el texto. Fuente: Diep y col. (2007).

II.1.3.2.6. Organización genética y biosíntesis

Las bacteriocinas se sintetizan como precursores inactivos o pre-probacteriocinas con un dominio C-terminal (probacteriocina o bacteriocina madura) unido a una extensión N-terminal, que es eliminada durante el transporte al exterior de la bacteriocina madura (Nes y col. 1996; Cintas y col., 2001). En ocasiones las probacteriocinas sufren modificaciones posttraduccionales como el establecimiento de anillos tioéter en los lantibióticos, necesarias para la generación del

péptido activo (McAuliffe y col., 2001). En las bacteriocinas se reconocen 2 tipos de extensiones N-terminales (Herranz, 2000; Cintas y col., 2001; Gutiérrez, 2005):

- (a) “Secuencia líder” del tipo “doble glicina”, caracterizada por la presencia de dos glicinas conservadas en su extremo C-terminal reconocidas por transportadores-ABC (del inglés *“ATP Binding Cassette”*) y sus proteínas accesorias y responsables del procesamiento de la secuencia líder y secreción de la bacteriocina madura al medio extracelular (Håvarstein y col., 1995) (Sección II.2.1.).
- (b) Secuencias tipo “péptido señal” (SP, del inglés *“Signal Peptide”*) que permiten el procesamiento y secreción de las bacteriocinas por la ruta general de transporte (GSP, del inglés *“General Secretory Pathway”*) (van Wely y col., 2001; Kuipers y col., 2006; Driessen y Nouwen, 2008) (Sección II.2.2.).

En general, dichas extensiones N-terminales desempeñan un papel fundamental en: (i) el procesamiento, transporte y secreción de la probacteriocina o bacteriocina madura al medio exocelular; (ii) las modificaciones posttraduccionales de ciertos lantibióticos, y/o (iii) la protección del hospedador, impidiendo que la bacteriocina sea biológicamente activa mientras se encuentra en el interior de las células productoras (Martínez y col., 2000b; Cintas y col., 2001; Gutiérrez, 2005). Sin embargo, existen bacteriocinas producidas por BAL sintetizadas sin una extensión N-terminal, como son la enterocina L50 (L50A y L50B) (Cintas y col., 1998), la enterocina Q (Cintas y col., 2000c; Criado y col., 2006a), la bacteriocina LsbB (Gajic y col., 2003) y la enterocina EJ97 (Gálvez y col., 1998; Sánchez-Hidalgo y col., 2003). De la mayoría de ellas, con excepción de la bacteriocina LsbB y enterocina Q, no se conocen todavía los mecanismos moleculares que rigen su procesamiento, transporte y/o secreción.

A su vez, los determinantes genéticos asociados a la síntesis de las bacteriocinas y que se localizan en plásmidos, en el cromosoma bacteriano o en transposones insertados en el cromosoma, se agrupan generalmente en uno o dos operones y constan de los siguientes componentes (Nissen-Meyer y Nes., 1997; Cintas y col., 2001; Diep y Nes, 2002; Eijsink y col., 2002; Drider y col., 2006):

- (1). Gen estructural, que codifica la pre-probacteriocina. En el caso de los sistemas de dos péptidos (clase IIb), los genes estructurales que codifican las dos pre-probacteriocinas se encuentran contiguos.
- (2). Gen de inmunidad, que codifica la proteína que protege a la célula productora de su propia bacteriocina. Este gen se cotranscribe con el gen estructural en la mayoría de los casos, aunque en algunas bacteriocinas como la carnobacteriocina A y la enterocina B el gen de inmunidad se encuentra localizado en sentido inverso al del gen estructural (Franz y col., 1999b, 2000).
- (3). Genes que codifican las proteínas responsables del procesamiento, transporte y secreción de la pre-probacteriocina.
- (4). Genes que codifican enzimas responsables de las modificaciones post-traduccionales de la probacteriocina.

- (5). Genes que codifican componentes involucrados en la regulación de la síntesis de la pre-probacteriocina.

Adicionalmente, en las bacteriocinas cuya síntesis se encuentra regulada por un sistema de transducción de señal de tres componentes o “quorum sensing” (Cintas y col., 2001; Diep y Nes, 2002; Citti, 2005), se observan también los siguientes genes agrupados en un mismo operón:

- (1). Gen que codifica el precursor de la feromona o factor de inducción (IF, del inglés “*Induction Factor*”) que constituye la señal inicial del sistema de transducción de señal de tres componentes. Generalmente el IF es un péptido de pequeño tamaño molecular, catiónico y con capacidad para formar una hélice α anfifílica (Herranz, 2000; Cintas y col., 2001). Estos péptidos requieren pequeñas concentraciones para ejercer su actividad biológica (Nes y Eijsink, 1999) y carecen de actividad antimicrobiana, excepto la plantaricina A (Anderssen y col., 1998) y la nisina, que induce su propia síntesis (Kuipers y col., 1995).
- (2). Gen que codifica la proteína sensora histidín-quinasa (HPK, del inglés “*Histidine Protein Kinase*”) compuesta por dos dominios, N-terminal y C-terminal, localizados a nivel periplásmico y citosólico, respectivamente, unidos por un dominio transmembrana. El dominio N-terminal posee una función sensora mientras que el dominio C-terminal activa a la proteína reguladora de respuesta (Sablon y col., 2000; Cintas y col., 2001).
- (3). Gen de la proteína reguladora de respuesta (RR) que posee un dominio N-terminal con un residuo conservado de ácido aspártico que representa el lugar de fosforilación y un dominio C-terminal encargado de mediar la respuesta adaptativa mediante un mecanismo de regulación de la transcripción (Sablon y col., 2000; Cintas y col., 2001).

El mecanismo de inducción es un mecanismo de regulación muy extendido en las bacterias, que consiste, en líneas generales, en una serie de fosforilaciones y desfosforilaciones acopladas que se producen cuando el factor de inducción alcanza una determinada concentración, lo cual es indicativo de que se ha alcanzado una determinada concentración celular de una población bacteriana. Es decir, el péptido inductor actúa, básicamente, como una molécula señal (feromona) que es secretada en pequeñas cantidades pero a un ritmo constante por las células bacterianas. Por lo tanto, su concentración es un reflejo de la densidad celular alcanzada durante el crecimiento bacteriano (Miller y Bassler, 2001). De este modo, la desfosforilación de la HPK y la subsiguiente fosforilación del dominio receptor de la proteína RR, favorecen una serie de cambios intramoleculares que posibilitan la interacción de la proteína RR con regiones específicas próximas al promotor, lo que estimula o inhibe la unión de la ARN polimerasa a su promotor y, por tanto, la síntesis de la bacteriocina (Diep y col., 1996; Risøen y col., 2000; Diep y Nes, 2002). Hasta la fecha, el modelo de autorregulación mejor evaluado es el de la nisina A (Fig. 2.6).

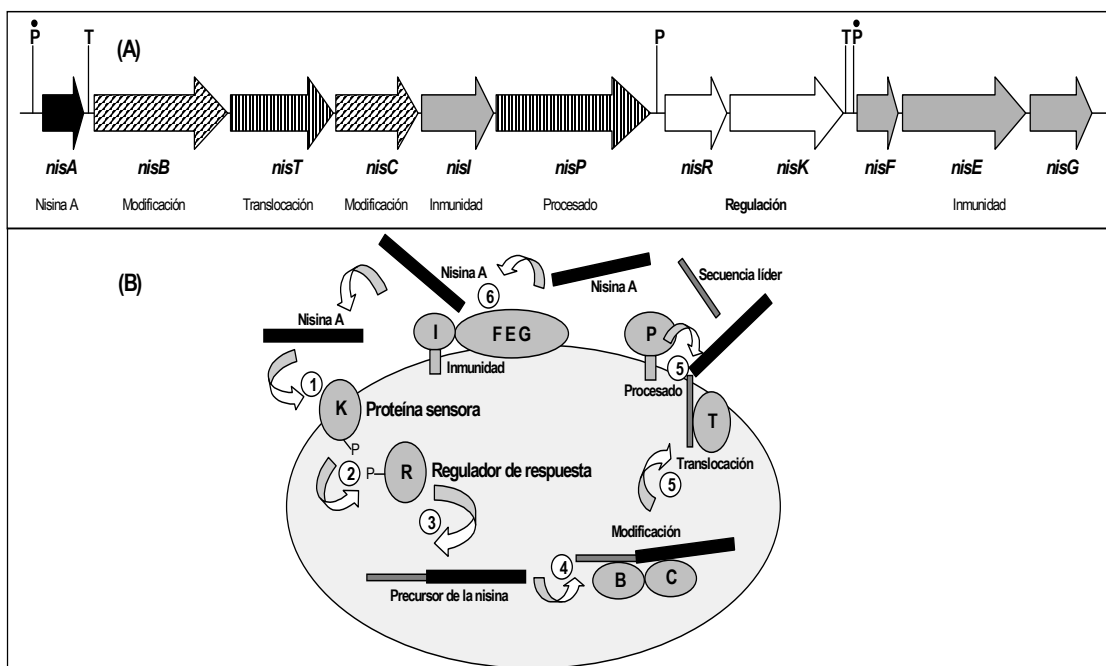


Figura 2.6. (A) Organización de los determinantes genéticos que intervienen en la biosíntesis de la nisina A. Las funciones de las proteínas codificadas se indican debajo de sus respectivos genes. P es el promotor y T el terminador de transcripción. El punto encima del promotor indica que el promotor es inducible. **(B) Modelo de biosíntesis de la nisina A:** (1) en presencia de nisina extracelular, la proteína sensora histidín-quinasa NisK se fosforila; (2) la proteína NisK fosforilada cede su grupo fosfato a la proteína reguladora de respuesta NisR; (3) la proteína NisR fosforilada activa la transcripción de la síntesis del precursor de la nisina y del resto de enzimas que intervienen en la biosíntesis del lantibiótico; (4) el péptido pre-pronisina A precursor es modificado por las enzimas NisB y NisC; (5) el precursor modificado es procesado y transportado por la proteasa NisP y el transportador-ABC NisT, originando la nisina madura; (6) las proteínas NisI, NisF, NisE y NisG protegen a la célula productora de la actividad bactericida de la nisina. Las proteínas NisK y NisR se encuentran siempre en el interior de la célula ya que la transcripción de sus genes se encuentra regulada por un promotor constitutivo. La nisina A extracelular actúa como factor de inducción. Fuente: Kuipers y col. (1995; 1998).

II.1.3.3. Consideraciones sobre las bacteriocinas de la clase IIa y las bacteriocinas sintetizadas sin secuencia líder o péptido señal

Una vez descritos los aspectos más relevantes de las bacteriocinas en general, a continuación se realizará una consideración más detallada de las bacteriocinas de las clases IIa, de las bacteriocinas similares a la pediocina ("pediocin-like") y de las bacteriocinas sintetizadas sin una secuencia líder o péptido señal.

II.1.3.3.1. Bacteriocinas de la clase IIa

El hecho de que a las bacteriocinas de la clase IIa se les reconozca como bacteriocinas "similares a la pediocina" o "pediocin-like", se debe a que la pediocina PA-1 fue la primera bacteriocina caracterizada de la clase IIa (Biswas y col., 1991; Nieto y col., 1992). En los últimos años ha aumentado el interés por este grupo de bacteriocinas, debido a su posible utilidad como aditivos antimicrobianos naturales de los alimentos para la preservación de los mismos, como complementos a los tratamientos antibióticos, o incluso como agentes antivirales (Cleveland y col., 2001; Ingham y col., 2003; Wachsman y col., 2003). La mayoría de las bacteriocinas de este

grupo inhiben el desarrollo de bacterias Gram-positivas patógenas o alterantes de los alimentos como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

Las bacteriocinas de la clase IIa son de pequeño tamaño molecular (<10 kDa), termoestables, sin modificaciones postraduccionales, de entre 37 y 48 aminoácidos, con una carga neta positiva y con un pI entre 8 y 10. Presentan una región N-terminal cargada e hidrofílica con una zona altamente conservada o secuencia consenso (Fig. 2.7) y un puente disulfuro formado por dos cisteínas, mientras que la región C-terminal es más variable, hidrofóbica y/o anfifílica. Resultados experimentales (Quadri y col., 1997; Miller y col., 1998) sugieren que la secuencia consenso YGNGV de su región N-terminal es la responsable de la actividad antilisteria característica de las bacteriocinas de esta clase. Además, en las bacteriocinas de la clase IIa los residuos cargados positivamente se localizan, en su mayoría, en la región N-terminal, y parecen ser los responsables de la unión inicial de la bacteriocina a las células diana (Chen y col., 1997).

	1	10	20	30	40
Mesentericin Y105	K	Y	Y	G	N
Leucocin A	K	Y	Y	G	N
Leucocin C	K	N	Y	G	N
Mundticin	K	Y	Y	G	N
Mundticin KS	K	Y	Y	G	N
Sakacin P	K	Y	Y	G	N
Curvacin A	A	R	S	Y	G
Piscicolin 126	K	Y	Y	G	N
Carnobacteriocin Bm1	A	I	S	Y	G
Carnobacteriocin B2	V	N	Y	G	N
Bavaricin MN	T	K	Y	Y	G
Bacteriocin 31	A	T	Y	Y	G
Enterocin P	A	T	R	S	Y
Bifidocin B	K	Y	Y	G	N
Sakacin G	K	Y	Y	G	N
Pediocin PA-1	K	Y	Y	G	N
Coagulin	K	Y	Y	G	N
Enterocin A	T	T	H	S	G
Divercin V41	T	K	Y	Y	G
Plantaricin 423	K	Y	Y	G	N
Plantaricin C19	K	Y	Y	G	N
Listeriocin 743A	K	S	Y	G	N
Sakacin 5X	K	Y	Y	G	N
Lactococcin MMFII	T	S	Y	G	N
Bifidocin B	K	Y	Y	H	N
Consensus	Y	Y	G	N	G
	C		C	V	W
			A		I

Figura 2.7. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la forma madura de las bacteriocinas de la clase IIa. La secuencia consenso está marcada en negrita. Los residuos de cisteína implicados en la formación del puente disulfuro de la región N-terminal están subrayados. Fuente: Modificado de Drider y col. (2006).

Por otro lado, la región C-terminal de las bacteriocinas de esta clase parece ser determinante de su especificidad por las células sensibles. En este sentido, diversos trabajos realizados con bacteriocinas híbridas derivadas de la fusión génica de las regiones N-terminal y C-Terminal de diferentes bacteriocinas de la clase IIa, han demostrado que la bacteriocina híbrida resultante muestra una especificidad similar a la bacteriocina de la que deriva su región C-terminal (Fimland y col., 1996). Hasta ahora se ha determinado la estructura tridimensional (3D) de cuatro bacteriocinas de la clase IIa: carnobacteriocina B2, curvacina A, leucocina A y sakacina P.

Generalmente, la región N-terminal de estas bacteriocinas adopta una estructura en lámina β estabilizada por un puente disulfuro, mientras que la región C-terminal adopta una conformación de una o dos α -hélices terminando, generalmente, con una cola extendida. En algunas bacteriocinas de este grupo como la sakacina G, la plantaricina 423, la pediocina PA-1, la divercina V41 y la enterocina A, existe un puente disulfuro adicional en la región C-terminal que les confiere una estructura molecular más estable (Wang y col., 1999; Haugen y col., 2005; Fregeau Gallagher y col., 1997; Uteng y col., 2003; Fimland y col., 2005).

Por lo general, los genes que codifican las bacteriocinas de la clase IIa están localizados en plásmidos, con excepción de la enterocina A, divercina V41, sakacina P y carnobacterias B2 y BM1, que se encuentran en el cromosoma bacteriano. Asimismo, como la mayoría de bacteriocinas de esta clase se procesan, secretan y transportan mediante un sistema de transporte dedicado (DTS) por transportadores-ABC (ver sección II.2.1), para su producción son necesarios al menos cuatro genes: (i) el gen estructural de la bacteriocina, (ii) el gen de inmunidad, (iii) el gen que codifica el transportador-ABC y (iv) el gen que codifica una proteína accesoria de función aún desconocida. No obstante, conviene saber que algunas bacteriocinas de la clase IIa se liberan al exterior celular mediante la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente (ver sección II.2.2), como ocurre con la bacteriocina 31, la enterocina P y la listeriocina 431. También se conoce que los genes requeridos para su procesamiento, transporte y secreción se localizan en un solo operón (pediocina PA-1, plantaricina 423) o en varios operones, con el gen estructural y el de inmunidad en un operón, los genes encargados de su procesamiento, transporte y secreción en un segundo operón, y un tercer operón con los genes implicados en la regulación de la producción (Ennahar y col., 2000). Incluso es posible que los genes implicados en la síntesis de bacteriocinas de la clase IIa no se localicen en un mismo lugar ni determinante genético. De hecho, Miller y col. (2005) han determinado que el gen estructural y el de inmunidad de la pediocina PA-1 producida por *Pediococcus parvulus* y *Lactobacillus plantarum* WHE92 se localizaban en un plásmido, mientras que los genes encargados de su procesamiento, transporte y secreción se encontraban en otro plásmido diferente.

Además del sistema de transducción de señal de tres componentes (reconocido como "quorum sensing"), basado en la densidad celular de los cultivos y descrito en una sección previa de esta memoria, en la regulación de la síntesis de bacteriocinas de la clase IIa pueden intervenir otros factores como la temperatura de crecimiento, la carga iónica o el pH (Cintas y col., 1997; Fimland y col., 2000; Leroy y De Vuyst, 1999). En algunos casos, la producción de bacteriocina es mayor a temperaturas próximas a los 20°C, mientras que va descendiendo hasta ser nula a temperaturas próximas a los 37°C o superiores (Cintas y col., 1997; Diep y col., 2000). En el caso de la sakacina A producida por *Lactobacillus sakei* 706 y cuya síntesis está regulada por un sistema de transducción de señal de tres componentes o "quorum sensing", se ha observado que no es posible inducir la producción de bacteriocina añadiendo el péptido inductor cuando el microorganismo crece a una temperatura cercana a los 37°C (Nes y Eijsink, 1999; Diep y col., 2000). Por tanto, la regulación de su producción basada en la temperatura parece prevalecer sobre el mecanismo "quorum sensing".

Hasta ahora, y como se ha comentado en esta memoria, todavía se conoce poco acerca de los mecanismos de inmunidad de las bacteriocinas y muchas de las experiencias realizadas en

este campo no hacen sino abrir más interrogantes. Las bacteriocinas de la clase IIa no son una excepción en este aspecto. Tan sólo se ha determinado la estructura 3D de las proteínas de inmunidad de la carnobacteriocina B2 y de la enterocina A y se ha comprobado que, a pesar de que estas proteínas confieren inmunidad frente a dos bacteriocinas de la clase IIa muy distintas, tienen básicamente la misma estructura (Sprules y col., 2004; Johnsen y col., 2005b). Sin embargo, a pesar de la similitud en su estructura 3D, se sabe que las proteínas de inmunidad poseen una elevada especificidad respecto a la bacteriocina frente a la cual confieren inmunidad, protegiendo a la cepa productora contra su propia bacteriocina y, en casos excepcionales, contra otra bacteriocina de la clase IIa. Esta protección cruzada suele producirse entre bacteriocinas muy similares, como la sakacina P y la pediocina PA-1, cuyas proteínas de inmunidad a pesar de que sólo muestran un 28% de similitud, protegen eficazmente frente a sendas bacteriocinas (Fimland y col., 2002). En un principio se pensó que las proteínas de inmunidad podían inactivar a las bacteriocinas activas cuando se encuentran en el exterior celular. Sin embargo, se ha observado que cuando se expresan en células sensibles, las proteínas de inmunidad protegen eficazmente a las células productoras frente a las bacteriocinas añadidas externamente. Por el contrario, cuando ambas proteínas (la bacteriocina y su respectiva proteína de inmunidad) se añaden externamente, no se observa protección alguna, lo que induce a pensar que las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas de la clase IIa actúan a nivel celular interno (Sprules y col., 2004). Resultados similares se han observado con bacteriocinas de otras clases, como la proteína de inmunidad de la lactococina A, bacteriocina perteneciente a la clase IIc (Venema y col., 1994; Diep y col., 2007). Por ello, se han propuesto distintos modelos de actuación de las proteínas de inmunidad. En uno de ellos (Fimland y col., 2002; Johnsen y col., 2005a y 2005b), se propone que la bacteriocina y la proteína de inmunidad se localizan en caras opuestas de la membrana y no existe contacto directo entre ambas. De esta manera, se considera que la propia membrana, o algún componente específico integrado en ella, juega un papel crucial como mediador en el reconocimiento entre ambas moléculas.

Recientemente se ha propuesto otro modelo, descrito previamente en esta memoria (Diep y col., 2007; ver Fig. 2.5), en el que algunas bacteriocinas podrían usar componentes del sistema de la manosa-fosfotransferasa (Man-PTS) como receptores específicos de las células diana, actuando a este nivel sus proteínas de inmunidad. Sin embargo, si las bacteriocinas de la clase IIa interactuaran con este receptor, sería difícil explicar la especificidad de su inmunidad. Incluso podría argumentarse el requerimiento de la existencia de otras moléculas, además de las proteínas de inmunidad, para que ésta fuese activa. Esta hipótesis resulta favorecida por observaciones relativamente recientes en las que se comprueba que la funcionalidad de las proteínas de inmunidad depende del microorganismo en el que se expresen (Fimland y col., 2002; Johnsen y col., 2004). Además, se ha observado que en casos en los que la producción de la bacteriocina se regula por “quorum sensing”, la sensibilidad del microorganismo productor frente a su propia bacteriocina y a otras bacteriocinas de la clase IIa varía dependiendo de si se encuentra en un estado de producción o no, es decir, de si la síntesis de la bacteriocina se ha activado o no (Diep y col., 2007). No obstante, aún queda mucho por aclarar acerca del mecanismo de inmunidad de las bacteriocinas de la clase IIa y de todas las bacteriocinas en general, siendo actualmente mayor el número de preguntas que el de respuestas.

II.1.3.3.2. Bacteriocinas sintetizadas sin secuencia líder o péptido señal

Como se ha citado previamente, se conoce que algunas bacteriocinas producidas por BAL se sintetizan sin una extensión N-terminal como ocurre con la enterocina L50 (L50A y L50B) (Cintas y col., 1998), la enterocina Q (Cintas y col., 2000c; Criado y col., 2006a), la bacteriocina LsbB (Gajic y col., 2003) y la enterocina EJ97 (Gálvez y col., 1998; Sánchez-Hidalgo y col., 2003). En algunas clasificaciones propuestas, las bacteriocinas sintetizadas sin una extensión N-terminal (secuencia líder o péptido señal) constituyen una clase diferente (Franz y col., 2007). Sin embargo, en la clasificación empleada en esta memoria (Cotter y col., 2005a), las bacteriocinas sintetizadas sin secuencia líder o péptido señal no constituyen un grupo o una clase *per se*, sino que son un conjunto de bacteriocinas con esa peculiaridad en común que pertenecen a diferentes clases. Por tanto, este grupo incluye a bacteriocinas que carecen de la secuencia consenso YGNGV, se sintetizan sin secuencia líder o péptido señal, y, probablemente, requieren sistemas de procesamiento, transporte y secreción dedicados. La enterocina L50 (EntL50A y EntL50B) es una bacteriocina codificada por los genes *entL50A* y *entL50B*, colinealmente localizados y separados por un pequeño espacio intergénico (<30-pb) presumiblemente con una única unidad de transcripción y cuya actividad antimicrobiana radica en la de dos péptidos con actividad antagonista individual pero sinérgicos entre sí. Sin embargo, la enterocina Q, la bacteriocina LsbB y la enterocina EJ97 son péptidos codificados por genes individuales no asociados colinealmente a otros y con actividad antimicrobiana individual. Todas las bacteriocinas citadas presentan dos residuos de lisina (K) en las posiciones 10 y 21 de su secuencia aminoacídica (Tabla II.2) y, aunque los mecanismos moleculares que rigen su procesamiento, transporte y secreción aún no se han descrito, excepto para la bacteriocina LsbB producida por *L. lactis* BGM-1 (Gajic y col., 2003) y la enterocina Q producida por *E. faecium* L50, posiblemente se secreten mediante sistemas de transporte dedicados del tipo transportadores-ABC o de transportadores-ABC de resistencia a otros compuestos activos (MDR) (del inglés “*Multidrug Resistance Transporters*”).

Tabla II.2. Secuencia aminoacídica de algunas bacteriocinas sintetizadas sin péptido señal o secuencia líder

Bacteriocina	Secuencia aminoacídica
Enterocin L50A	MGAIAKLVAKFGWPIVKKY Y KQIMQF I GEGWAINKI I EWIKKHI
Enterocin MR10A*	MGAIAKLVAKFGWPIVKKY Y KQIMQF I GEGWAINKI I DWIKKHI
Enterocin RJ-11*	APAGLVAK F GRPIVKKY Y KQIMQF I GEGSAINKI I PW I ARMWRT
Enterocin L50B	MGAIAKLVT K FGWPLIKKF Y KQIMQF I GQGWITDQIEK W LKRH
Enterocin MR10B*	MGAIAKLVAKFGWPFIKKF Y KQIMQF I GQGWITDQIEK W LKRH
Enterocin Q	MNFLKNGIAKWMGTGAELQ A YKKKYGCLP W EKISC
Enterocin EJ97	MLAKI K AMIKKFPNPYTLAAKLTT Y EIN W YKQYGRYP W ERPVA

En azul, residuos de aminoácidos conservados en todas las bacteriocinas; en rojo, residuos de aminoácidos conservados en grado variable. * Secuencia líder o péptido señal sin determinar. Fuente: Franz y col. (2007).

La enterocina L50 (EntL50A y EntL50B) es una bacteriocina producida por *E. faecium* L50 (Cintas y col., 1998) y otros enterococos de las especies *E. durans* (Batdorj y col., 2006) y *E. faecium* (Moreno y col., 2002; Achemchem y col., 2005; Martín y col., 2006; Sánchez y col., 2007a; Theppangna y col., 2007), aislados de nichos ecológicos o ecosistemas muy diferentes. También se conoce (Cintas y col., 1998; Criado y col., 2006a) que los determinantes génicos que codifican la EntL50A y EntL50B de *E. faecium* L50, se encuentran en un plásmido de 50 kb denominado pCIZ1. Anteriormente, Cintas y col., (1998) determinaron que la enterocina L50

consiste en dos péptidos, EntL50A y EntL50B, de 44 y 43 aminoácidos respectivamente, que manifiestan actividad antimicrobiana individual y, además, un efecto sinérgico cuando se combinan. Aunque ambos péptidos tienen 21 aminoácidos en común y una homología del 72%, la actividad antimicrobiana individual de la EntL50A es mayor que la de la EntL50B. La enterocina L50 (EntL50A y EntL50B) posee un amplio espectro antimicrobiano, inhibiendo cepas de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Pediococcus*, así como microorganismos patógenos como *L. monocytogenes* y *B. cereus* (Cintas y col., 1998).

Además de la enterocina L50, *E. faecium* L50 produce la enterocina P (EntP) y la enterocina Q (EntQ), ésta última también sintetizada sin secuencia líder o péptido señal (Cintas y col., 2000c). La EntQ es relativamente pequeña (34 aminoácidos) y, aunque no contiene la secuencia consenso YGNGV, presenta dos residuos de cisteína en las posiciones 26 y 34, lo que sugiere la posible formación de un puente disulfuro en su región C-terminal, a diferencia de lo que ocurre con otras bacteriocinas que presentan dicho enlace en la región N-terminal (EntP) o en ambas regiones (pediocina PA-1). El gen estructural de la enterocina Q (*entqA*) se localiza en *E. faecium* L50 en un plásmido de 7.383 pb, denominado pClZ2, y está precedido por dos genes orientados en sentido inverso respecto al anterior (*entqB* y *entqC*) (Criado y col., 2006a). Estudios recientes han determinado que la proteína EntqB es similar a los transportadores-ABC de otras bacteriocinas mientras que la proteína EntqC no muestra homología significativa con ninguna otra proteína o péptido conocido. Estudios bioquímicos y genéticos han confirmado que la proteína EntqB es responsable del procesamiento, transporte y secreción de la bacteriocina EntQ, mientras que la proteína EntqC le confiere inmunidad a dicha bacteriocina (EntQ) (Criado y col., 2006a).

E. faecalis EJ97, aislado de aguas residuales urbanas, produce la enterocina EJ97. Esta bacteriocina, con una masa molecular de 5.340 Da, muestra actividad antimicrobiana frente a especies del género *Bacillus*, *Enterococcus* y *Listeria*, así como frente a cepas de *S. aureus* (Gálvez y col., 1998). Los genes responsables de la producción de la enterocina EJ97 se localizan en un plásmido conjugativo inducible por feromonas de 60 kb denominado pEJ97, y su gen estructural codifica un péptido de 44 aminoácidos que carece de extensión N-terminal. Además, se han hallado genes que posiblemente codifican proteínas del tipo transportadores-ABC, próximos al mencionado gen estructural, que podrían estar involucrados en su procesamiento, transporte y secreción (Sánchez-Hidalgo y col., 2003). La enterocina EJ97 presenta cierta homología con otras bacteriocinas que se sintetizan sin secuencia líder o péptido señal (Tabla II.2), incluyendo los tres residuos conservados de lisina (K) en las posiciones 6, 10 y 21, el residuo conservado de isoleucina (I) en posición 21, así como el residuo conservado de triptófano (W) en posición 39, al final de la región C-terminal. No obstante, la relación estructura-función de estos residuos conservados aún se desconoce.

La bacteriocina LsbB es una bacteriocina de la clase IId, producida por *L. lactis*, con un reducido espectro antimicrobiano, también sintetizada sin secuencia líder o péptido señal, y cuya secuencia es de sólo 30 aminoácidos. Curiosamente, dicha bacteriocina se produce junto con la bacteriocina LsbA que, por el contrario, sí presenta una extensión N-terminal, aunque de características singulares (Gajic y col., 2003). Los genes que codifican ambas bacteriocinas, *lsbA* y *lsbB*, se encuentran uno a continuación de otro, separados por algunos pares de bases y en sentido opuesto. A continuación de *lsbB* y en el mismo sentido que *lsbA*, se encuentra el gen

ImrB que codifica la proteína LmrB, miembro de la familia de los transportadores-ABC, implicado en el transporte y la inmunidad de ambas bacteriocinas, LsbA y LsbB, (Gajic y col., 2003).

II.1.4. ASPECTOS DE SEGURIDAD DE LOS ENTEROCOCOS

II.1.4.1. Los enterococos como patógenos oportunistas

Como se ha dicho previamente, los enterococos son microorganismos ubicuos que se hallan en una gran variedad de ecosistemas debido, sobre todo, a su gran capacidad para sobrevivir y desarrollarse bajo condiciones ambientales extremas. Por tanto, no sólo están asociados al tracto gastrointestinal de personas y animales, sino que también se pueden aislar del suelo, agua, alimentos, vegetales, insectos, etc. En las personas, los enterococos constituyen parte de su flora intestinal normal e incluso pueden encontrarse, aunque en una proporción mucho menor, en otras localizaciones tales como secreciones orofaríngeas, secreciones vaginales y en la piel, especialmente en la zona perineal, de tal manera que se consideran comensales habituales del organismo humano. Antes de la identificación de cepas multirresistentes a antibióticos a finales de los 70, los enterococos se consideraban inofensivos, con la excepción de los causantes de endocarditis. Sin embargo, a lo largo de las dos últimas décadas, los enterococos se han identificado como microorganismos responsables de infecciones nosocomiales como bacteriemias, endocarditis y diversos tipos de infecciones del tracto urinario, sistema nervioso central, pélvicas, intraabdominales, en heridas, y en neonatos (Franz y col., 2003; Kayser, 2003). No obstante, los enterococos se consideran microorganismos con una baja patogenicidad intrínseca así como con un bajo potencial de virulencia y, generalmente, son necesarias alteraciones del sistema inmune del hospedador para que desarrollen infecciones. Esto les confiere ante todo un carácter oportunista, ya que en la mayor parte de los casos se identifican como parte de una flora microbiana mixta causando infecciones en pacientes con enfermedades subyacentes severas y, sólo en algunas ocasiones, se han identificado como los únicos agentes responsables de bacteriemias o endocarditis en pacientes inmunodeprimidos. Por tanto, un prerequisite necesario para que los enterococos causen enfermedad es la existencia de deficiencias en los mecanismos de defensa del hospedador frente a dichos microorganismos. Los factores de riesgo más importantes para la aparición de infecciones nosocomiales por enterococos son el padecimiento de enfermedades subyacentes severas, largas estancias en hospitales, insuficiencia renal, neutropenia, inmunosupresión, trasplantes (especialmente de hígado y médula ósea), presencia de catéteres urinarios o vasculares, estancia en unidades de cuidados intensivos y una terapia antibiótica previa frente a alguna enfermedad infecciosa con antibióticos frente a los que los enterococos poseen una resistencia natural o sensibilidad intermedia, como cefalosporinas o fluoroquinolonas respectivamente (Kayser, 2003).

De las más de 20 especies de enterococos identificadas hasta ahora, dos especies son las responsables de la gran mayoría de las infecciones: *E. faecalis* (80-90% de los aislados clínicos) y *E. faecium* (5-15%). Sin embargo, datos recientes indican que la proporción de cepas de *E. faecium* multirresistentes, está aumentando (Huycke y col., 1998). Además, recientemente se han aislado cepas de *E. faecium* responsables de bacteriemias y de infecciones pulmonares, probablemente como consecuencia del incremento en el número de aislados de esta especie resistentes a la vancomicina (VRE, del inglés "*Vancomycin Resistant Enterococci*") (Mundy y col., 2000; Vancanneyt y col., 2002; Klare y col., 2003; MacEachern y col., 2005).

Una de las causas que contribuyen a la patogénesis de los enterococos es su resistencia a antibióticos, lo que dificulta la terapia de las enfermedades causadas por ellos, disminuyendo drásticamente el número de antibióticos disponibles para su tratamiento (Murray, 1990; Leclercq, 1997). Los enterococos son naturalmente resistentes a antibióticos como las cefalosporinas, β -lactámicos, sulfonamidas y a bajos niveles de clindamicina y aminoglucósidos. Dichas resistencias intrínsecas suelen estar mediadas por genes localizados en el cromosoma. Además, los enterococos adquieren resistencias bien por mutación de genes cromosomales o por transferencia de genes que las codifican a través de plásmidos o transposones. Algunos ejemplos de resistencias adquiridas por mutación son las resistencias a aminopenicilinas por la alteración de las proteínas de unión a las penicilinas ("penicillin-binding proteins"), a las fluoroquinolonas y a las rifampicinas. Ejemplos de resistencias adquiridas por transferencia de genes son las resistencias a tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol y a elevadas concentraciones de aminoglucósidos y glucopéptidos (Kayser y col., 2003), entre los que destaca la vancomicina (Murray, 1990) (Franz y col., 2003).

El empleo de los enterococos como cultivos iniciadores en alimentos fermentados y como probióticos en alimentación humana y animal resulta también controvertido, debido a que algunas cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* se consideran agentes responsables de infecciones nosocomiales en personas. Además, el que algunas cepas puedan poseer y transferir genes de resistencia a antibióticos plantea un posible riesgo en el empleo de dichos microorganismos en la industria alimentaria. No obstante, aunque la existencia de genes de resistencias a antibióticos puede favorecer la selección y prevalencia de determinadas cepas de enterococos en el ambiente hospitalario, para que estos microorganismos desarrollen la enfermedad es necesario, además, que expresen factores de virulencia que intervengan en alguna de las etapas de la patogénesis de la mayoría de las infecciones. A grandes rasgos, las enfermedades nosocomiales producidas por enterococos tienen lugar en dos pasos (Kayser, 2003):

- (1). Fase inicial, generalmente asintomática, de colonización de los tejidos del hospedador, habitualmente el tracto gastrointestinal o más raramente la piel, por cepas endémicas en el hospital (provenientes de otros pacientes, del personal del hospital o del ambiente hospitalario). Una vez colonizados los tejidos, los pacientes pueden portarlos durante meses o incluso años.
- (2). Invasión de los tejidos previamente colonizados, con la subsiguiente aparición de enfermedad si los mecanismos de defensa del hospedador, tanto específicos como inespecíficos, no son eficaces.

Generalmente, los microorganismos hospitalarios, entre ellos los enterococos, poseen uno o más factores de virulencia y/o de resistencia a antibióticos, lo que les permite sobrevivir, permanecer y distribuirse rápidamente en el ambiente hospitalario al eliminar a otros competidores que no poseen genes de resistencia a antibióticos. Aunque, en el caso de los enterococos, debido a su carácter oportunista, es necesario que coincidan una serie de factores tanto del huésped (enfermedades subyacentes severas, inmunodepresión, largas estancias en el hospital, etc) como del propio microorganismo (factores de virulencia) para que se desencadene la enfermedad. Por tanto, sólo ocasionalmente los enterococos invaden los tejidos y desarrollan la enfermedad (Kayser, 2003).

II.1.4.2. Factores de virulencia de los enterococos

Actualmente se sabe muy poco acerca de los factores de virulencia de los enterococos que contribuyen a su capacidad para producir enfermedades en las personas. Bien es verdad que no hay un único factor fundamental responsable de su virulencia como ocurre en otros microorganismos, sino que pueden ser varios los factores de virulencia que juegan algún papel en su patogénesis, siendo la mayoría de los descritos hasta ahora productos de secreción, como la citolisina y la gelatinasa, o factores de adhesión como la sustancia de agregación (Agg o AS, según autor, del inglés “*Aggregation Substance*”) y la proteína de superficie de los enterococos (Esp, del inglés “*Enterococcal Surface Protein*”) (Tabla II.3). Además, es bien sabido que la resistencia a los antibióticos ejerce un papel importante en las infecciones ocasionadas por enterococos (Mundy y col., 2000). Por tanto, a continuación se van a describir algunos de los principales factores de virulencia de los enterococos.

Tabla II.3. Factores de virulencia identificados en microorganismos del género *Enterococcus*

Gen(es)	Función(es) en la virulencia de su producto
<i>agg</i>	Proteína de agregación involucrada en la adherencia a células eucariotas, agregación celular y conjugación
<i>gelE</i>	Toxina. Metaloendopeptidasa extracelular que hidroliza la gelatina, el colágeno, la hemoglobina y otros compuestos bioactivos
<i>cylL</i> , <i>cylS</i>	Precusores de la citolisina. Para la producción de citolisina activa se requieren la expresión de los genes <i>cylL</i> - <i>Ls</i> , - <i>M</i> , - <i>B</i> y - <i>A</i> . La molécula activa es capaz de lisar células eucariotas y bacterias Gram-positivas
<i>cylM</i>	Modificación posttraduccional de la citolisina
<i>cylB</i>	Transporte de la citolisina
<i>cylA</i>	Activación de la citolisina
<i>esp</i>	Proteína asociada a la pared celular involucrada en la evasión de la respuesta inmune; se puede asociar a los genes <i>cyl</i> en una isla de patogenicidad
<i>efaAfs</i> , <i>efaAfm</i>	Adhesinas de la pared celular presentes en el suero de personas portadoras de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> respectivamente
<i>cpd</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> , <i>cad</i>	Feromonas sexuales implicadas en fenómenos de conjugación y quimiotáxicas para leucocitos humanos

Fuente: Eaton y Gasson (2001).

II.1.4.2.1. Sustancia de agregación

La sustancia de agregación (Agg) es una proteína de superficie de *E. faecalis* codificada en plásmidos inducibles por feromonas, que promueve la formación de agregados durante la conjugación bacteriana (Clewel, 1993). Su expresión es por tanto inducida por feromonas sexuales, péptidos hidrofóbicos de pequeño tamaño molecular codificados y secretados por plásmidos (Franz y col., 2003; Donelli y col., 2004). Durante la conjugación bacteriana, en la célula donante expuesta a feromonas se induce la síntesis de la Agg que, al unirse a la sustancia de unión de enterococos (EBS, del inglés “*Enterococcal Binding Substance*”), un receptor presente en la superficie de las células receptoras, facilita la agrupación y el contacto de las células donantes y receptoras, y la transferencia a la receptora del plásmido que codifica la Agg. Los plásmidos regulados por feromonas se han descrito tanto en *E. faecalis* como *E. faecium* y se encuentran en ambas especies relacionados con determinantes de virulencia. Asimismo, las feromonas secretadas por las células productoras originan una respuesta inflamatoria en el hospedador, inducen la secreción de peróxido de hidrógeno y enzimas de los lisosomas, y son quimiotáxicas para leucocitos humanos y de ratas, por lo que también podrían considerarse como factores potenciales de virulencia (Eaton y Gasson, 2001).

Además, esta sustancia de agregación también desempeña un papel importante en la adherencia de los enterococos a células eucariotas, debido a la presencia en su secuencia aminoacídica de dos motivos RGD (Arg-Gly-Asp) reconocidos por integrinas, una familia de receptores presentes en células eucariotas como leucocitos, trombocitos, macrófagos y células del epitelio intestinal (Sartingen y col., 2000; Süßmuth y col., 2002). Sin embargo, dicha sustancia no sólo promueve la unión a células eucariotas sino también a proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, trombospodina, vitronectina y colágeno tipo I (Rozdzinski y col., 2001), lo que se ha relacionado con la translocación de los enterococos a través de los tejidos del hospedador.

Normalmente los enterococos atraviesan el epitelio intestinal o el genitourinario para llegar hasta el sistema linfático y/o vascular, aunque se dispone de pocos datos sobre la translocación de los enterococos a través de células epiteliales intactas. No obstante, cuando el epitelio intestinal se encuentra dañado, las proteínas de la matriz extracelular se encuentran expuestas, situación que parece aumentar la capacidad de los enterococos que expresan la Agg de unirse a estas proteínas, pudiendo favorecer de esta manera su translocación. Asimismo, se sabe que cuando existe un daño endotelial la incidencia de las endocarditis producidas por enterococos es mucho mayor, lo que sugiere el importante papel que juega la adherencia de los enterococos a las proteínas de la matriz extracelular en la patogénesis de estas infecciones (Franz y col., 2003). Algunos investigadores han propuesto que la Agg favorece la supervivencia intracelular de *E. faecalis* dentro de los neutrófilos por la prevención, o al menos el retraso, de la fusión del fagosoma con el lisosoma para formar el fagolisosoma (Kayser, 2003). Hasta ahora, la Agg ha sido encontrada exclusivamente en *E. faecalis* aunque su incidencia en los aislados de alimentos parece ser alta (Eaton y Gasson, 2001; Franz y col., 2001).

En conclusión, la presencia de la Agg favorece la adhesión y la invasión celular, la translocación de los enterococos a través de los tejidos del hospedador y la evasión de la respuesta inmune, constituyendo un importante factor de virulencia en la patogénesis de infecciones que tienen como agentes causales a los enterococos.

II.1.4.2.2. Proteína de superficie de enterococos

La proteína de superficie de enterococos (Esp) fue descrita por primera vez por Shankar y col., (1999) en un aislado clínico resistente a la gentamicina, concretamente el *E. faecalis* MMH594. Esta adhesina está codificada en el cromosoma bacteriano por el gen *esp* que, recientemente, ha sido asociado a una gran isla de patogenicidad (PAI, del inglés "*Pathogenicity Island*") de unas 153 kb (Shankar y col., 2002). Las PAIs o islas de patogenicidad (IP) están constituidas por fragmentos génicos de gran tamaño, con un porcentaje diferente de G+C en comparación con el del ADN cromosómico y en las que se localizan los genes que codifican transposasas, reguladores transcripcionales y factores potenciales de virulencia. La incidencia del gen *esp* en *E. faecalis* es relativamente elevada, sobre todo en aislados de endocarditis, siendo menos frecuente en *E. faecium*, aunque se ha descrito recientemente en aislados clínicos de *E. faecium* una variante de esta proteína, Esp_{fm}, localizada en una posible isla de patogenicidad (Eaton y Gasson, 2001; Willems y col., 2001; Leavis y col., 2004). Aunque no existe confirmación experimental, la elevada prevalencia del gen *esp* en aislados clínicos de *E. faecalis* y *E. faecium* sugiere que la Esp ejerce un papel importante en la patogénesis de las

infecciones ocasionadas por ambas especies de enterococos (Eaton y Gasson, 2001, 2002; Coque y col., 2002; Vergis y col., 2002; Harrington y col., 2004).

La producción de Esp incrementa la hidrofobicidad celular, la adherencia de las células productoras a superficies abióticas y la formación de “*biofilms*” *in vitro* (Toledo-Arana y col., 2001). Los “*biofilms*” o películas biológicas son comunidades bacterianas unidas a un sustrato biótico o abiótico integradas en una matriz que puede estar compuesta por carbohidratos, ADN, o proteínas (O’Toole y col., 2000; Lewis, 2001; Donlan y Costerton, 2002; Whitchur y col., 2002). Además, basándose en la similitud de la Esp con receptores proteicos de superficie denominados “componentes de superficie microbianos que reconocen moléculas de unión de la matriz” (MSCRAMs, del inglés “*Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules*”) y que facilitan la unión a proteínas de la matriz extracelular, se ha sugerido la posibilidad de interacción de Esp con la matriz extracelular, promoviendo así la colonización de los tejidos del hospedador (Toledo-Arana y col., 2001). Este aumento de la capacidad de formación de “*biofilms*” asociado a la presencia del gen *esp*, tiene implicaciones obvias para pacientes con implantes médicos como catéteres venosos, catéteres urinarios, prótesis de cadera y otras articulaciones, dispositivos intrauterinos y válvulas cardíacas protésicas, contribuyendo al desarrollo de infecciones nosocomiales y a la patogénesis de infecciones crónicas como las endocarditis bacterianas (Donlan 2002; Parsek y Singh, 2003). Recientemente, Tendolkar y col. (2004) han demostrado que la producción de Esp incrementa significativamente la capacidad de *E. faecalis* para formar “*biofilms*”, aunque la inactivación de la expresión del gen *esp* no muestra un marcado efecto negativo sobre la formación de los mismos, lo que sugiere la existencia de otros factores que contribuyen a la formación de “*biofilms*”. Por tanto, la producción de Esp parece contribuir a la adhesión, colonización y propagación de los enterococos en los tejidos del hospedador. Por ello, las moléculas implicadas en la adherencia de los microorganismos a superficies abióticas y en la formación de *biofilms*, como la Esp, podrían considerarse como dianas terapéuticas en el control y la erradicación de posibles infecciones.

II.1.4.2.3. Otras adhesinas de importancia en enterococos

La adhesina del colágeno de *E. faecalis* (Ace, del inglés “*Adhesin of Collagen from E. faecalis*”) es una proteína que forma parte de los MSCRAMs (Rich y col., 1999; Nallapareddy y col., 2000a) siendo por tanto capaz de interactuar con proteínas de la matriz extracelular como el colágeno tipo I y tipo IV y la laminina, favoreciendo la unión de los enterococos a las células del hospedador (Nallapareddy y col., 2000b). La adhesina Ace se expresa por los enterococos durante el proceso infeccioso, de forma que, el 90% de los sueros de pacientes con endocarditis reaccionan con anticuerpos anti-Ace capaces de inhibir la adherencia de la molécula a las proteínas de la matriz extracelular (Nallapareddy y col., 2000a).

Otras moléculas consideradas como potenciales factores de virulencia de los enterococos son los antígenos similares a las adhesinas, producidos por *E. faecalis* (EfaA_{fs}) y *E. faecium* (EfaA_{fm}). Concretamente, el antígeno de *E. faecalis* (EfaA_{fs}) muestra una gran homología con otras adhesinas de estreptococos como PsaA, SsaB, FimA y ScaA. Hasta ahora el papel del antígeno EfaA_{fs} sólo se ha demostrado en la patogénesis de algunas infecciones como las endocarditis, donde se cree que interviene en la adhesión de *E. faecalis* a las células

endocárdicas, mientras que la función del antígeno EfaA_{fm} aún se desconoce (Singh y col., 1998; Franz y col., 2003).

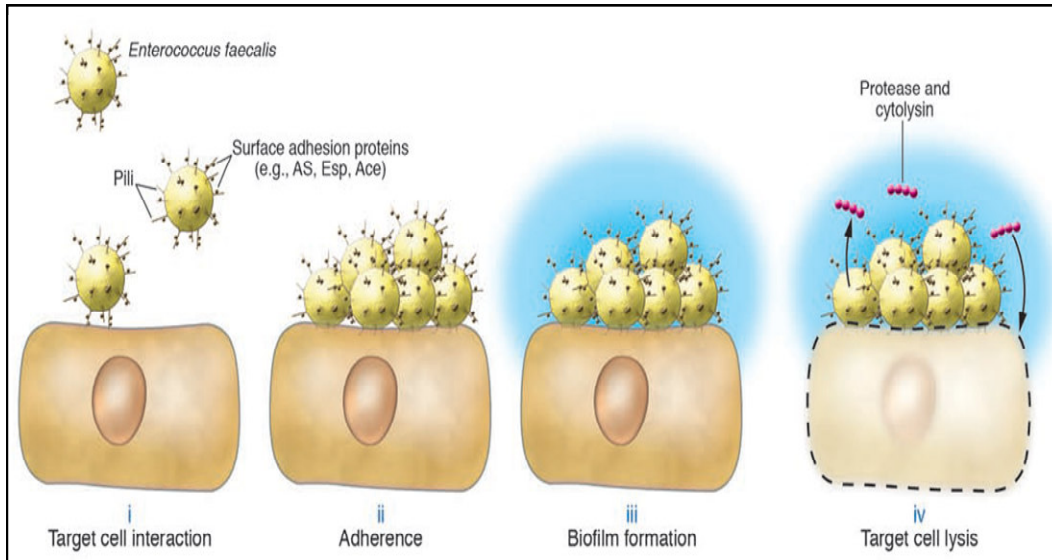


Figura 2.8. Papel de los filamentos de superficie ("pili") en una infección por *E. faecalis*. Los enterococos probablemente empleen dichos filamentos para fijarse o adherirse a los tejidos del hospedador (i). Seguidamente, a través de las proteínas de superficie (Agg, Esp, y Ace) establecen una unión más fuerte y estable con las células hospedadoras (ii). La agregación de enterococos induce la formación de biofilms (iii) y, por último, se produce la matriz de exopolisacáridos (representada por la superficie azul). La expresión de proteasas y citolisinas producen la muerte de la célula hospedadora y propaga la infección (iv). Fuente: Budzik y Schneewind (2006).

Estudios recientes parecen confirmar que además de las adhesinas, unos filamentos o "pelos" de superficie ("pili") podrían intervenir también en la unión de los enterococos a las células del hospedador, al menos en la fase inicial de esa unión (Figs. 2.8 y 2.9). Además, estos filamentos son antígenicos en personas y están codificados por un operón muy ubicuo en *E. faecalis*, lo que sugiere que la inmunización de animales y personas con subunidades de estos filamentos podría prevenir la infección (Nallapareddy y col., 2006; Budzik y Schneewind, 2006).

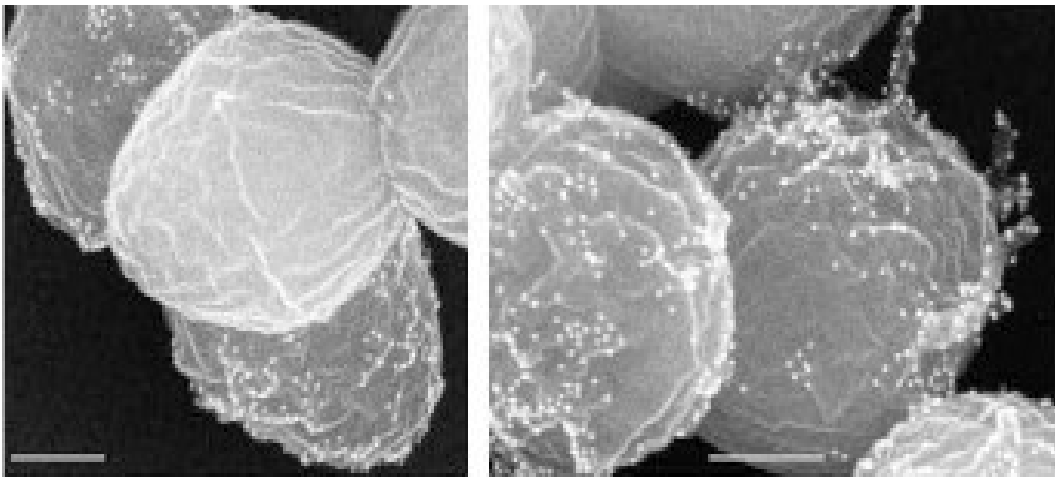


Figura 2.9. Imágenes de microscopía electrónica con tinción de oro empleando anticuerpos anti-proteínas Ebp (del inglés "encoding endocarditis and biofilm-associated pili") en *E. faecalis* OG1RF en las que se evidencian estructuras pilosas en la superficie. La longitud de la barra corresponde a 200 nm. Fuente: Nallapareddy y col. (2006).

De hecho, dos trabajos recientes lo corroboran ya que han demostrado que la inmunización de animales con subunidades de dichos filamentos previene la meningitis neonatal por estreptococos del grupo B o la infección por estreptococos del grupo A (Maione y col., 2005; Mora y col., 2005). Por tanto, el descubrimiento de estos filamentos o “estructuras pilosas” que intervienen en la unión inicial de los enterococos a los tejidos del hospedador podría ayudar a desarrollar nuevas estrategias de prevención y tratamiento de infecciones producidas por enterococos, siendo una alternativa terapéutica ante el continuo aumento de su resistencia a los antibióticos.

II.1.4.2.4. Gelatinasa

La gelatinasa (GelE) es una metaloendopeptidasa extracelular producida por *E. faecalis* capaz de degradar sustratos como la gelatina, fragmentos insolubles de colágeno, la cadena β de la insulina, la hemoglobina, la endotelina-1, la fibrina polimerizada y otros péptidos bioactivos de los tejidos del hospedador, mejorando la migración y difusión de los enterococos por los tejidos dañados (Waters y col., 2003). Además, también está implicada en la degradación de feromonas sexuales y de péptidos involucrados en la transferencia de plásmidos por conjugación entre diferentes cepas de *E. faecalis* (Makinen y col., 1989, 1994).

El gen *gelE* se localiza en un operón en el que también se encuentra el gen *sprE*, que codifica una serín-proteasa (SprE). Hacia arriba de los genes *gelE* y *sprE* se localizan tres genes más denominados *fsr* (del inglés “*E. faecalis* Regulator”), que regulan positivamente la expresión de la GelE y la SprE de *E. faecalis* (Qin y col., 2000, 2001). En este contexto, se sabe que el sistema regulador Fsr de *E. faecalis* está constituido por tres genes, *fsrA*, *fsrB* y *fsrC*, que codifican un regulador de respuesta, un péptido inductor y una proteína sensora, respectivamente. El gen *fsrA* se localiza en *E. faecalis* hacia arriba de *fsrB* y *fsrC*. A su vez, la expresión de los genes *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, *gelE* y *sprE* está regulada por tres promotores diferentes. El sistema Fsr y los productos de los genes regulados GelE y SprE contribuyen a la patogénesis en diferentes modelos de infección en animales, entre los que se incluyen los de peritonitis en ratones, endoftalmitis en conejos e infecciones en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Qin y col., 2000; Mylonakis y col., 2002; Sifri y col., 2002; Engelbert y col., 2004). Recientemente, Hancock y Perego (2004) han demostrado el efecto del sistema regulador Fsr de *E. faecalis* en el desarrollo de “biofilms” mediante la producción de GelE. Por lo tanto, la inactivación del gen *gelE* prevendría o inhibiría la formación de “biofilms”, lo que sugiere que la posible actuación sobre la producción de esta metaloendopeptidasa podría constituir una alternativa más en el tratamiento de las endocarditis causadas por enterococos productores de “biofilms”.

II.1.4.2.5. Citolisina o hemolisina β

Los primeros informes sobre la existencia de esta molécula datan de los años 40, en los que se observó y evaluó la inhibición del crecimiento de otras bacterias por algunos streptococos β -hemolíticos del grupo D (Sherwood y col., 1949). Hacia los años 60 se hallaron suficientes evidencias experimentales para afirmar que la actividad hemolítica y de inhibición del crecimiento bacteriano eran debidas a un único compuesto, por lo que se afirmó que la hemolisina/bacteriocina de *E. faecalis* era un componente natural bifuncional, que por simplificar

fue denominado citolisina (Brock y Davie, 1963; Granato y Jackson, 1969; Gilmore y col., 1994). Actualmente se sabe que la hemolisina β o citolisina (Cyl, del inglés “Cytolysin”) es una toxina extracelular sintetizada por numerosos aislados de *E. faecalis* capaz de lisar eritrocitos y otras células eucariotas y procariotas, y que también se reconoce como una bacteriocina (Franz y col., 2003; Kayser, 2003). Análisis de la secuencia aminoacídica de la citolisina purificada de *E. faecalis* revelaron que pertenece a la clase I o lantibióticos (Gilmore y col., 1994), siendo la única bacteriocina de este grupo capaz de lisar células eucarióticas. Esta toxina/bacteriocina posee un interés especial porque su actividad incrementa la virulencia de los enterococos en diferentes modelos de infección y, además, diversos estudios epidemiológicos asocian su presencia a un incremento en la mortalidad de los pacientes (Jett y col., 1992; Chow y col., 1993; Huycke y Gilmore, 1995; Dupont y col., 1998).

Estudios recientes sobre la síntesis de la citolisina (Cyl) han revelado que para su producción es necesaria la expresión de ocho genes situados en un único operón que bien puede estar localizado en el cromosoma, en plásmidos regulados por feromonas o en una isla de patogenicidad (IP) y asociados a otros factores de virulencia como la Agg y la Esp (Gilmore y col., 1994; Haas y col., 2002; Shankar y col., 2002, 2004). La transcripción de los ocho genes que constituyen el operón de la Cyl, denominados *cylR1*, *cylR2*, *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *cylB*, *cylA* y *cylI* (Fig. 2.10), se encuentra controlada por dos promotores orientados en sentidos opuestos, P_L y P_R (Haas y col., 2002; Shankar y col., 2004). El promotor P_L se localiza delante y en el mismo sentido que *cylL_L* y regula la expresión de los genes estructurales *cylL_L* y *cylL_S*, de los responsables de las modificaciones posttraduccionales, procesamiento y secreción de ambas subunidades (*cylM*, *cylB* y *cylA*) y del gen de inmunidad (*cylI*), mientras que el P_R se localiza delante de *cylR1*, en sentido opuesto a P_L y controla la transcripción de los genes reguladores *cylR1* y *cylR2*. A su vez, el promotor P_L se encuentra reprimido por las proteínas reguladoras CylR1 y CylR2 (Shankar y col., 2004). Por tanto, los genes *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *cylB*, *cylA* y *cylI* se transcriben como una unidad transcripcional, mientras que los genes reguladores *cylR1* y *cylR2* se transcriben en sentido opuesto y como una segunda unidad transcripcional.

En la Figura 2.10 se muestra el modelo de síntesis, maduración y regulación de la producción de la Cyl de *E. faecalis*. Las subunidades estructurales CylL_L y CylL_S son codificadas por *cylL_L* y *cylL_S* y se sintetizan como precursores peptídicos de 68 y 63 aminoácidos, respectivamente, que, tras modificarse posttraduccionamente por el producto del tercer gen del operón, la CylM, dan lugar a las subunidades CylL_L* y CylL_S*. Después de la modificación, ambos productos interaccionan con el producto del gen *cylB*, la CylB, que es un transportador-ABC similar al empleado para el procesamiento, transporte y secreción de las bacteriocinas de la clase I o lantibióticos (Fath y Kolter, 1993) y con actividad peptidasa. Esta proteína se encarga del transporte y secreción de ambas subunidades a través de la membrana celular y de eliminar proteolíticamente la secuencia líder de cada una de ellas (de 24 y 36 aminoácidos respectivamente), originando las subunidades CylL_L' y CylL_S'. La secuencia líder de ambas subunidades posee un fragmento de 16 aminoácidos idénticos, constituyendo posiblemente el sitio de unión a CylB o el dominio de reconocimiento de corte. A continuación, una vez que ambas subunidades están en el exterior, una serín-proteasa codificada por *cylA* (CylA), elimina un fragmento idéntico de seis aminoácidos del extremo N-terminal de cada una de las subunidades, generando las subunidades activas CylL_L” y CylL_S”. CylI es la proteína de

inmunidad encargada de proteger a la célula productora de la actividad antimicrobiana de la Cyl (Haas y col., 2002; Coburn y Gilmore, 2003; Shankar y col., 2004).

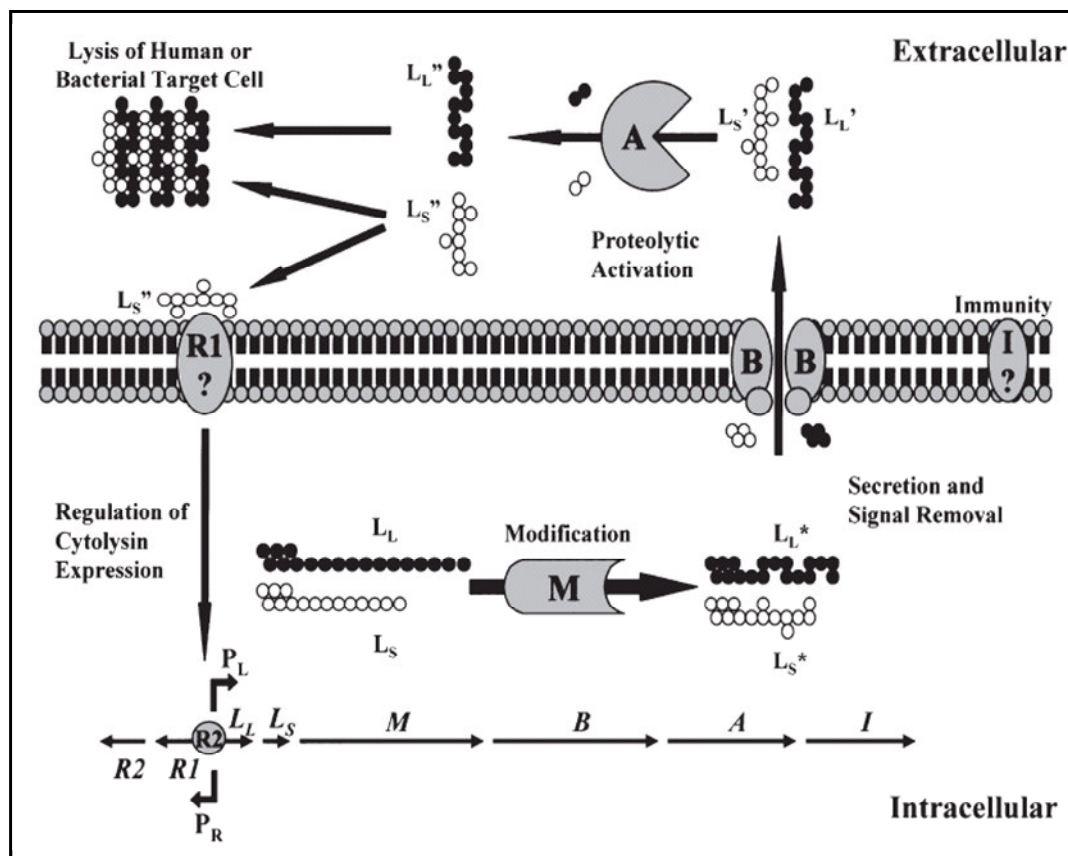


Figura 2.10. Modelo para la expresión de la citolisina (Cyl) de *E. faecalis*. Fuente: Coburn y Gilmore (2003).

La producción y secreción de la Cyl se encuentran reguladas por un mecanismo de regulación dependiente de la densidad celular (sistema "quorum sensing") que requiere la actuación de las proteínas CylR1, CylR2 y de la subunidad CylLs". Las proteínas CylR1 y CylR2 (codificadas por los genes *cylR1* y *cylR2*) reprimen la transcripción de los genes regulados por P_L . Shankar y col. (2004) propusieron un modelo de regulación para la producción y expresión de la Cyl en el que CylR2 impediría el acceso de la ARN polimerasa al promotor P_L , reprimiendo la transcripción del operón de la citolisina. CylR1, un receptor transmembrana, interaccionaría intracelularmente con CylR2 estabilizando el complejo represor. A su vez, la presencia de CylR1 en la membrana podría permitirle interaccionar con el péptido inductor, CylLs", y esta unión desestabilizaría el complejo CylR1-CylR2, por lo que CylR2 se liberaría de su lugar de unión permitiendo la transcripción de los genes estructurales de la Cyl. Conviene destacar que la inducción de este sistema regulador es dependiente de la densidad celular.

En un estudio reciente, Semedo y col. (2003b) examinaron la presencia de diversos factores de virulencia, entre ellos la citolisina, en enterococos aislados de alimentos y muestras clínicas. Se observó que la presencia del operón *cyl* y el potencial hemolítico estaban muy extendidos, con una asociación muy significativa de este factor de virulencia con los aislados clínicos, lo que no ocurría con otros factores de virulencia evaluados (adhesinas de superficie, proteasas, etc.) que mostraban una incidencia elevada independientemente de su origen. Además, se llegaron a

describir hasta 15 genotipos diferentes del operón *cyl*, así como genes *cyl* silentes. Por tanto, los resultados obtenidos mostraron que los factores de virulencia se encuentran en los enterococos independientemente de su origen o localización (hospedadores humanos y animales, alimentos y ambiente) sugiriendo que dichos determinantes genéticos son una característica común de los enterococos. Así mismo, dichos determinantes genéticos codifican proteínas (citolisinas, adhesinas, etc.) que pueden realizar igualmente funciones adaptativas en el hospedador o en el medio en que se desarrollan los enterococos (lisis de eritrocitos o bacterias competidoras; adhesión a células del hospedador o superficies abióticas y formación de biofilms protectores; hidrólisis de componentes de tejidos del hospedador y nutrientes poliméricos) y su expresión puede ser regulada por mecanismos adaptativos relacionados con el origen o el ecosistema. No obstante, dichos factores de virulencia no deberían ser considerados como tales *per se*, sino que deberían contemplarse en el contexto apropiado. Sin embargo, aunque se han aislado enterococos de diversos alimentos e incluso se han utilizado tradicionalmente como flora iniciadora, especialmente en productos artesanales o de manufactura tradicional, también conviene considerar su posible interacción con la población de riesgo (pacientes inmunodeprimidos, con largas estancias hospitalarias, con implantes médicos, sometidos a terapias antibióticas con fármacos frente a los que los enterococos son resistentes, etc.). Por tanto, siempre es recomendable la evaluación de la posible presencia de factores potenciales de virulencia en aquellas cepas de enterococos que pudieran emplearse en la industria alimentaria.

II.1.4.2.6. Resistencia a antibióticos y mecanismos de transferencia

Los enterococos constituyen un grupo microbiano que presentan resistencias a antibióticos, lo que les permite sobrevivir en ambientes hospitalarios facilitando su diseminación por los mismos (Murray, 1990; Franz y col., 1999a). Como se ha mencionado previamente, los enterococos son naturalmente resistentes a algunos antibióticos y desarrollan o adquieren resistencias a otros por diversos mecanismos (Kayser, 2003; Klare y col., 2003). De interés es la resistencia a penicilinas, principalmente a la ampicilina, disminuyendo la afinidad de las penicilinas por su receptor; la resistencia a elevados niveles de aminoglucósidos, debido a la alteración de su molécula por enzimas modificadoras como fosfotransferasas y acetiltransferasas; la resistencia a glucopéptidos, mediada por modificaciones en el pentapéptido del precursor de la mureína que impide la unión del antibiótico a la célula diana; la resistencia a macrólidos, lincosaminas y estreptograminas del grupo B, basado en la acción de acetiltransferasas e hidrolasas; y la resistencia frente al cloranfenicol, tetraciclinas y quinolonas, a través de variados mecanismos de resistencia.

La resistencia a niveles elevados de glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina y avoparcina) son las de mayor interés clínico, ya que la vancomicina se utiliza en el tratamiento de infecciones originadas por enterococos multirresistentes (Franz y col., 2003). Hasta ahora se han descrito seis fenotipos distintos de resistencia a glucopéptidos, cinco adquiridos y uno intrínseco o natural: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE y VanG. El VanA es el de mayor importancia clínica ya que se encuentra ampliamente distribuido en el género *Enterococcus*, principalmente en *E. faecium* y le confiere resistencia cruzada a la vancomicina, teicoplanina y avoparcina. VanB es el segundo en importancia y las cepas de este fenotipo muestran resistencia a niveles variables de vancomicina, pero todas ellas son susceptibles a teicoplanina. El gen *vanC* se localiza intrínsecamente en *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens*, a los que confiere resistencia a

bajos niveles de vancomicina. Finalmente los fenotipos VanD, VanE y VanG son de menor relevancia clínica y sólo se han descrito en algunas cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* (Dutka-Malen y col., 1995; Franz y col., 1999a; McKessar y col., 2000; Kayser, 2003; Klare y col., 2003).

La situación existente en Europa y E.E.U.U. respecto la resistencia a los glucopéptidos, concretamente la vancomicina, es diferente. En Europa, el principal reservorio de enterococos VanA son los animales de abasto debido al empleo habitual de avoparcina a dosis subterapéuticas como promotor de crecimiento, ya que la avoparcina confiere resistencia cruzada frente a la vancomicina. De esta manera se ha contribuido a la aparición de enterococos resistentes a vancomicina (VRE), lo que se ha visto reflejado en estudios epidemiológicos que evidencian la ubicuidad de VRE en nuestros animales de abasto. La consiguiente colonización entérica de VRE en personas sanas ha sido también documentada (Klare y col., 1995) aunque, en contra de lo esperado, las infecciones con VRE en Europa son raras (Schouten y col., 2000). Por el contrario, en E.E.U.U. no se ha utilizado la avoparcina como promotor de crecimiento en los animales de abasto y los VRE no se detectan en animales, en productos cárnicos derivados ni en individuos sanos (Hayes y col., 2003). Sin embargo, la presencia de VRE en pacientes hospitalizados es endémica en muchos hospitales y las infecciones por VRE en pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades subyacentes está en aumento (Bonten y col., 2001).

La aparición de enterococos resistentes a antibióticos se relaciona también con la presión selectiva a la que están sometidos en lugares donde los antibióticos se emplean frecuentemente, como los hospitales, así como con la eficacia de transferencia de genes de resistencia y de factores potenciales de virulencia entre los enterococos como consecuencia de procesos de conjugación mediados por elementos génicos transferibles como trasposones, plásmidos regulados por feromonas y plásmidos conjugativos (Cocconcelli y col., 2003). Como se ha mencionado previamente, muchos enterococos codifican también adhesinas como la Agg que favorece los fenómenos de agregación entre células donantes y receptoras, facilitando de este modo los procesos de conjugación y la transferencia de genes. Diversos investigadores han evaluado en los alimentos la presencia de enterococos con genes que codifican factores potenciales de virulencia y de resistencia a antibióticos (Borgen y col., 2000, 2001; Eaton y Gasson, 2001; Gambarotto, 2001; Busani y col., 2004), así como la posible transferencia de dichos determinantes a otros microorganismos (Eaton y Gasson, 2001; Lund y Edlund, 2001; Cocconcelli y col. 2003). De esta manera, Eaton y Gasson (2001) han identificado genes que codifican resistencias a antibióticos y posibles factores de virulencia en *E. faecalis* de origen alimentario y han demostrado la capacidad de los enterococos empleados como cultivos iniciadores de adquirir por conjugación los plásmidos en los que se encuentran codificados, aunque con frecuencias de transferencia menores que en los de las cepas clínicas. Posteriormente, Cocconcelli y col. (2003) demostraron que, durante la fermentación de quesos y embutidos, los plásmidos con genes que codifican posibles factores de virulencia y de resistencia a antibióticos se transfieren con elevada frecuencia y de manera natural a otros enterococos.

Generalmente, los enterococos de origen alimentario no se consideran como causa directa de infección, aunque el consumo de alimentos colonizados con poblaciones microbianas resistentes a antibióticos o que expresan factores potenciales de virulencia podrían favorecer la colonización de tejidos del hospedador por estas cepas, o bien la transferencia de sus determinantes de virulencia a otros microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal del hospedador.

Recientemente, Jensen y col. (1999) han aislado de cerdos y pacientes hospitalizados en Dinamarca cepas de *E. faecium* VRE con patrones electroforéticos de campo pulsado similares. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Lu y col. (2002) al determinar que cepas de *E. faecium* aisladas de cerdos con un cuadro de “shock” hemorrágico y de granjeros con una sintomatología similar, mostraban idénticos patrones electroforéticos y de susceptibilidad a antibióticos, lo que sugiere una posible transmisión de los enterococos o de los genes que codifican distintos factores de virulencia de los animales o de los alimentos al hombre.

Aunque dentro de las BAL el género *Enterococcus* es de los más estudiados en relación a la presencia de factores de virulencia, cada vez son más los estudios sobre este mismo aspecto en BAL de otros géneros. La presencia de plásmidos es común en enterococos, lactococos, leuconostocs, pediococos y algunas cepas de lactobacilos y bifidobacterias (Dellaglio y col., 1995; Deveriese y Pot, 1995; Sgorbati y col., 1995; Simpson y Taguchi, 1995; Teuber, 1995) y se sabe que plásmidos conjugativos que codifican resistencias a antibióticos, como pAM β 1 y PIP501, se transfieren entre BAL de diversos géneros (Langella y col., 1993, de Mathur y Singh 2005). Por tanto, en lo referente a resistencias a antibióticos adquiridas dentro de las BAL no hay barreras entre patógenos (como los estreptococos), potencialmente patógenos (como los enterococos) y comensales (como lactobacilos y lactococos). Idénticos genes responsables de resistencias a antibióticos como *tet*(M) para la tetraciclina, *erm*AM para la eritromicina, *cat* para el cloranfenicol, *str* para la estreptomicina y *sat* para la estreptogramina, se han hallado en microorganismos de cada uno de los tres grupos anteriores. Los resultados descritos que las BAL, en ambientes sometidos a la presencia de antibióticos, participan en diversos sistemas de transferencia de genes de resistencia a antibióticos por encima de las fronteras de géneros y especies (Mathur y Singh, 2005).

II.1.4.3. Enterococos como cultivos iniciadores o probióticos

El aislamiento en diferentes tipos de quesos de cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* con buenas propiedades proteolíticas y acidificantes (Suzzi y col., 2000), la utilización de los enterococos como cultivos iniciadores en la producción de productos lácteos y cárnicos (Hugas y col., 2003; Giraffa y col., 1997), así como su contribución a la maduración, al desarrollo de las características sensoriales y a la obtención de productos únicos desde un punto de vista organoléptico (Sarantinopoulos y col., 2001; Franz y col., 2003), han fomentado la utilización de estos microorganismos como cultivos iniciadores (Giraffa y col., 2003).

La definición de “probiótico” ha evolucionado a medida que ha avanzado la comprensión de los mecanismos por los que influyen en la salud de las personas y de los animales. Un probiótico podría describirse como una preparación o un producto que contiene microorganismos viables en número suficiente (pudiendo ser sólo un microorganismo o una mezcla de varios), los cuales alteran la microbiota del hospedador por implantación o colonización, produciendo efectos beneficiosos en su salud (De Vuyst y col., 2004). Entre los efectos beneficiosos se incluyen la estimulación del sistema inmune, restauración o mantenimiento de una adecuada microflora intestinal, control de la diarrea asociada a antibióticos, reducción del colesterol sérico, reducción de los síntomas de la intolerancia a la lactosa, y el control y prevención de diarreas y úlceras microbianas. Además, se han descrito una serie de condiciones que un microorganismo debe

cumplir para considerarse un buen probiótico: (a) capacidad de adherirse temporalmente a las células intestinales; (b) reducir por exclusión la adhesión de patógenos a dichas células; (c) ser capaz de persistir y multiplicarse en el intestino; (d) producir ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas antagonistas al crecimiento de patógenos; y (e) ser seguro, no invasivo, no carcinogénico y no patogénico (Foulquié Moreno y col., 2006). La mayor parte de los microorganismos utilizados como probióticos pertenecen al género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Sin embargo, también se han empleado como probióticos, cepas de *E. faecium* y *E. faecalis*, aunque el uso de *E. faecalis* se ha destinado mayoritariamente a suplementos alimenticios para animales. Desde febrero de 2004, 10 preparaciones (9 cepas diferentes de *E. faecium*) se han autorizado como aditivos para piensos en la Unión Europea (European Commission, 2004). Un ejemplo de cepa del género *Enterococcus* empleada como probiótico es el *E. faecium* SF68, producido en Suecia y objeto de diversos estudios en los que ha probado su eficacia en el tratamiento de diarreas asociadas a antibióticos, diarreas en niños, diarrea aguda en adultos, e incluso como estimulador de la respuesta inmune en perros (Wunderlich y col., 1989; Bellomo y col., 1980; Buydens y Debeuckelaere, 1996; Benyacoub, 2003).

El uso de enterococos como probióticos o cultivos iniciadores es una cuestión controvertida. Por un lado está el beneficio que supone su empleo con una u otra aplicación, mientras que por el otro está el incremento en el número de infecciones asociadas a enterococos, así como la presencia en los enterococos de genes de resistencia a antibióticos y otros factores de virulencia con el consecuente riesgo para la salud del consumidor. Por tanto, sería deseable que los enterococos de origen alimentario no codificasen determinantes de virulencia ni mostrasen resistencia a antibióticos empleados en terapia humana. Por ello, es recomendable una evaluación exhaustiva de la posible presencia de factores de virulencia en aquellos enterococos que pudieran emplearse en la industria alimentaria. Generalmente, la incidencia de factores de virulencia en *E. faecium* es menor que en *E. faecalis*, por lo que las cepas no virulentas de *E. faecium* serían en principio las de elección para su utilización en la industria alimentaria o en piensos para animales. Este es el caso del ya mencionado *E. faecium* SF68, que se emplea como probiótico para el tratamiento de ciertos desórdenes intestinales y no codifica factores potenciales de virulencia ni posee plásmidos regulados por feromonas, por lo que no parece suponer un riesgo para la salud humana (Kayser, 2003).

No obstante, los enterococos codifican mecanismos de transferencia génica que pueden facilitar la adquisición de factores potenciales de virulencia de otras cepas de enterococos, lo que supone un posible riesgo para el uso de enterococos como cultivos iniciadores, protectores o probióticos. Dicha circunstancia es de especial relevancia en cepas de *E. faecalis* en las que la presencia de plásmidos feromona-dependientes es muy frecuente. Como se ha mencionado anteriormente, diversos estudios (Eaton y Gasson 2001; Cocconcelli y col. 2003) han demostrado la transferencia de factores potenciales de virulencia de cepas clínicas de enterococos a otras empleadas como cultivos iniciadores. En cualquier caso, es conveniente recordar que los enterococos se aíslan de muchos alimentos fermentados en los que parecen desarrollar una función beneficiosa. Además, en el mercado existen cepas de enterococos que llevan empleándose mucho tiempo como probióticos sin que se les haya implicado como posibles causas de enfermedad. No obstante, como se ha comentado previamente, los enterococos se consideran patógenos oportunistas y es infrecuente que desarrollen enfermedades en individuos sanos. Se sabe que determinados factores del hospedador, como

su condición fisiológica o la presencia de enfermedades subyacentes, favorecen el establecimiento de infecciones por enterococos. A este respecto es recomendable que los individuos inmunodeprimidos o con enfermedades subyacentes vigilen la ingesta de probióticos o de alimentos fermentados que contengan enterococos, ya que dichos microorganismos no pueden considerarse absolutamente seguros porque, aunque no posean factores de virulencia conocidos, no puede descartarse la presencia en ellos de otros factores todavía desconocidos.

II.2. PROCESAMIENTO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS LÁCTICAS

Todos los organismos vivos necesitan desplazar los péptidos o proteínas sintetizados intracelularmente a sus lugares de acción, y se calcula que aproximadamente el 20% de los péptidos o proteínas sintetizados por las bacterias se liberan parcial o totalmente al exterior celular mediante un proceso denominado translocación. En las bacterias Gram-positivas, la liberación de péptidos y proteínas al espacio extracelular conlleva su paso a través de la membrana citoplasmática, mientras que en las bacterias Gram-negativas las proteínas secretadas deben atravesar, además, su membrana externa, constituyendo así un proceso más costoso.

Las bacteriocinas, al ser péptidos antimicrobianos que ejercen su acción a nivel extracelular, van a someterse a diversos procesos que permiten su liberación al exterior celular. En el caso de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, como son bacterias Gram-positivas, sólo deben atravesar una “barrera”, la membrana citoplasmática, para llegar al medio extracelular. Dado que las células necesitan una “señal” para distinguir las proteínas citoplasmáticas de las secretadas al exterior, muchas de las proteínas secretadas se sintetizan como precursores inactivos con una secuencia señal (van Wely y col., 2001) que actúa como lugar de reconocimiento para su procesamiento, transporte y secreción. Por tanto, la mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL se sintetizan como precursores inactivos o prebacteriocinas con una extensión N-terminal (“secuencia señal”) de dos tipos: (a) secuencia del tipo “secuencia líder” o “doble glicina”, o (b) secuencia del tipo “péptido señal”. Cuando la extensión N-terminal es del tipo “doble glicina” el procesamiento, transporte y secreción de las bacteriocinas se realiza mediante transportadores-ABC o sistema de transporte dedicado (DTS, del inglés “*Dedicated transport System*”), mientras que cuando su extensión N-terminal es del tipo “péptido señal”, su procesamiento, transporte y secreción se realiza empleando la ruta general de secreción (GSP, del inglés “*General Secretory Pathway*”) o sistema Sec-dependiente. A continuación se describen ambos sistemas (DTS y GSP) por ser los mecanismos de procesamiento, transporte y secreción más relevantes de bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas.

II.2.1. SISTEMA TRANSPORTADOR-ABC O DE TRANSPORTE DEDICADO (DTS)

Los transportadores-ABC se encuentran en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en las que no sólo dirigen la secreción e importación de muchas sustancias, sino que también intervienen en numerosos procesos celulares y en su regulación (Fath y Kolter, 1993; Dassa y Bouige, 2001). Dichos transportadores constituyen una de las familias más abundantes de proteínas citoplásmicas y, de hecho, se conoce que casi el 5% del genoma de *E. coli* lo

constituyen genes que codifican componentes de este sistema transportador (Higgins, 2001). Los sistemas de secreción tipo I o transportadores-ABC son específicos para una proteína o grupo de proteínas de la misma familia, por lo que también se les conoce como sistemas de transporte dedicado (DTS) (Wandersman, 1992). Estos sistemas de secreción están compuestos por un miembro de la familia de transportadores-ABC, por una proteína accesoria de membrana y, en las bacterias Gram-negativas, por una proteína de la membrana externa (Fig. 2.12). Los genes que codifican el transportador-ABC y la proteína accesoria suelen ser contiguos, mientras que el que codifica la proteína de la membrana externa puede localizarse a continuación de los dos anteriores o separado de los mismos (Franke, 1998).

Tabla II.4. Secuencia aminoacídica de las extensiones N-terminales del tipo “secuencia líder” de algunas bacteriocinas

Bacteriocin	Leader peptide sequence						
	-30	-25	-20	-15	-10	-5	-1
Lantibiotics							
Nisin A						MSTKDFNLDLVS	VSKKDSGAS P R
Nisin Z						MSTKDFNLDLVS	VSKKDSGAS P R
Subtilin						MSKFDDFDLDV	VKVSQDSKI T P Q
Pep5						MKNNKNLFDL	BKKETSQNTDELE P Q
Epidermin ^a /staphylococcin 1580 ^a						MEAVKEKNDLF	NLDVKVNAKESNDGAB P R
Gallidermin						MEAVKEKNELF	DLVDKVNKESNDGAB P R
Salivaricin A						MNAMKNSKDIL	NNAIEVSEKELMEVA G G
SA-FF22						MBKNNEVIN	SIQEVSLBELDQI I G A
Lacticin 481 ^a /lactococcin DR ^a						MKEQNSFNLL	QEVTSBELDLIL G A
Non-lanthionine-containing bacteriocins							
Pediocin AcH ^a /pediocin PA-1						MKKIEKLTE	KEMANI I G G
Sakacin 674 ^a /sakacin P ^a						MEKPIELSL	KEVTAI T G G
Leucocin A						MMNMKPTES	YEQLDNSALEQVV G G
Sakacin A ^a /curvacin A ^a						MNNVKELSM	TELQTI T G G
Lactacin F						MKQPNYL	SHKDLAVVV G G
Carnobacteriocin A ^a /piscicolin 61 ^a						MNNVKELSI	KEMQVVT G G
Carnobacteriocin B2						MNSVKELNV	KEMQLH G G
Lactococcin A						MKNQLNPN	IVSDEELSEAN G G
Lactococcin B						MKNQLNPN	IVSDEELAEVN G G
Lactococcin M						MKNQLNFE	ILSDEELQGIN G G

^a Prepeptides with same amino acid sequence.

Fuente: Jack y col. (1995).

La mayoría de las bacteriocinas de la clase II se sintetizan como precursores inactivos con extensiones N-terminales del tipo “secuencia líder” o “doble glicina” que desempeñan un papel primordial en el reconocimiento y procesamiento de las pre-probacteriocinas, así como en su posterior secreción mediante transportadores-ABC. Además, dichas extensiones N-terminales mantienen inactivas a la mayoría de las bacteriocinas en el interior celular protegiendo al microorganismo productor de su efecto tóxico (Nes y col., 1996). Una “secuencia líder” típica posee: (i) dos residuos de glicina en las posiciones -1 y -2 con respecto al lugar de procesamiento; (ii) aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones -4, -7, -12 y -15; (iii) un residuo polar en la posición -8 y (iv) un residuo de serina en la posición -11 (Håvarstein y col., 1994, 1995). Con respecto a los lantibióticos, la estructura primaria de su secuencia líder varía, lo que permite dividir a los lantibióticos alongados y catiónicos en dos subgrupos: (i) en el que se incluyen la nisina A y Z, que poseen una secuencia líder con un lugar de procesamiento caracterizado por la presencia de aminoácidos polares en posición -1 y un residuo prolina en posición -2, y (ii) otro subgrupo en el que se incluyen los que poseen extensiones N-terminales del tipo “doble glicina” (Jack y col., 1995) (Tabla II.4).

A su vez, un transportador-ABC clásico consta de cuatro dominios, dos dominios transmembrana (TMD, del inglés “*Transmembrane Domain*”) situados en posición N-terminal y dos dominios de unión al ATP localizados a nivel C-terminal (NBD, del inglés “*Nucleotide-binding Domain*”) (Higgins, 2001). Los dominios TMD son hidrofóbicos, generalmente contienen seis segmentos transmembrana (TMS, del inglés “*Transmembrane Segment*”) y presentan un dominio proteolítico de, aproximadamente, 150 aminoácidos con residuos conservados de cisteína e histidina encargado de reconocer la pre-probacteriocina para, posteriormente, hidrolizar la secuencia líder a nivel de los dos residuos de glicina situados en su extremo C-terminal. Los dominios NBD son hidrofílicos, se encuentran situados en la cara interna de la membrana y presentan actividad ATP-asa (Håvarstein y col., 1995; Wandersman, 1998; Cintas y col., 2001). Generalmente, estos cuatro dominios se disponen como péptidos independientes aunque en ocasiones pueden unirse y actuar como un complejo polipeptídico único (Fig. 2.11).

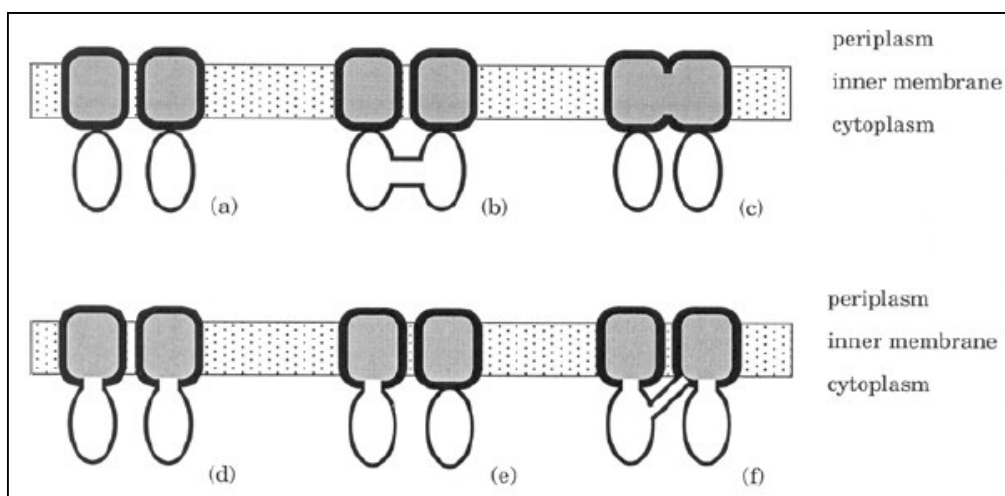


Figura 2.11. Organización de los transportadores-ABC. El transportador-ABC típico presenta cuatro dominios, dos TMDs (representados por cuadrados sombreados) y dos NBDs (representados por elipses). Los dominios se pueden presentar de las siguientes maneras: (A) codificados como cuatro polipéptidos independientes; (B) los NBDs unidos; (C) los TMDs unidos; (D) cada TMD unido al otro NBD constituyendo una proteína híbrida funcionando como un homodímero; (E) un TMD unido al otro NBD, permaneciendo los otros TMD y NBD como polipéptidos separados; (F) los cuatro dominios unidos en un único polipéptido, frecuente en transportadores-ABC de células eucariotas. Fuente: Higgins (2001).

Además, existe una proteína accesoria, la cual posee una región N-terminal localizada en el citoplasma, y una región C-terminal orientada hacia el lado extracelular de la membrana citoplasmática y que conecta con el extremo N-terminal mediante un segmento transmembrana (TMS) (Franke, 1998). La función exacta de las proteínas accesorias todavía no se conoce bien, aunque en las bacterias Gram-positivas resultan imprescindibles para la secreción de las bacteriocinas (Skaugen y col., 2003), y en las Gram-negativas parecen ser las encargadas de conectar la membrana interna con la externa (Fig. 2.12).

El modelo que explica el procesamiento, transporte y secreción de las bacteriocinas que contienen una secuencia líder con un lugar de procesamiento de tipo “doble glicina” fue propuesto por Håvarstein y col. (1995). Este modelo propone la unión de un precursor a cada uno de los dominios proteolíticos del transportador-ABC y la unión de dos moléculas de ATP en su dominio C-terminal, cuya hidrólisis libera la energía necesaria para inducir un cambio conformacional en el transportador, lo que resulta en el procesamiento y translocación de la probacteriocina o de la bacteriocina madura al exterior celular.

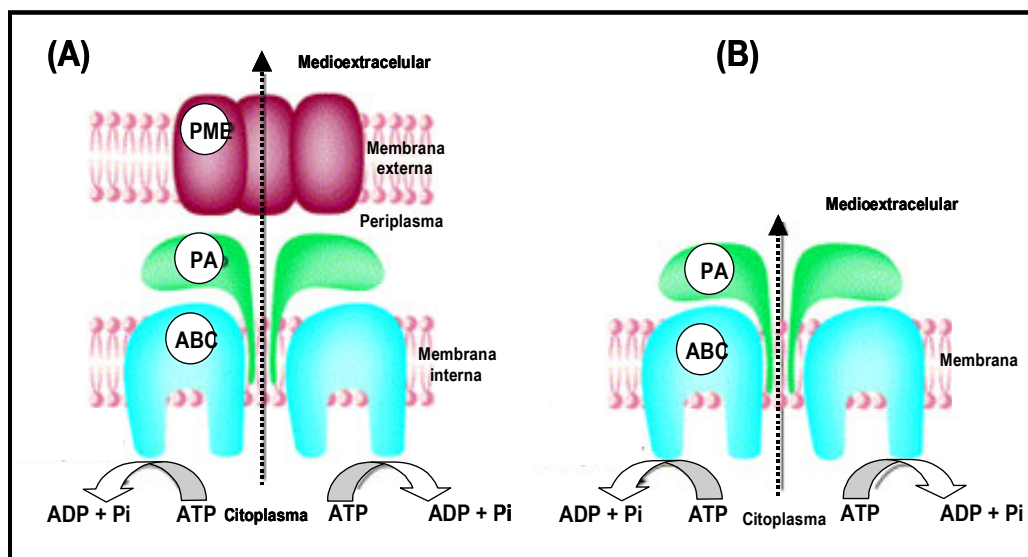


Figura 2.12. Secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas (A) y Gram-positivas (B) mediante un sistema de transporte dedicado (DTS) y el empleo de transportadores-ABC. La proteína transportadora (ABC) posee un dominio hidrofóbico N-terminal (I) y otro C-terminal (II) que contiene los sitios de unión para el ATP. La proteína accesoria (PA) interacciona con el transportador-ABC y, en las bacterias Gram-negativas, con una proteína de la membrana externa (PME), formando un canal de translocación. Fuente: Michiels y col. (2001).

Es posible que el procesamiento, transporte y secreción de la enterocina L50 (EntL50A y EntL50B), que se sintetiza sin una extensión N-terminal, pueda realizarse también mediante un sistema de transporte dedicado del tipo transportador-ABC, al igual que el de la hemolisina α de *E. coli*, la enterocina EJ97, la aureocina A70, la bacteriocina LsbB y las proteínas de virulencia de *Yersinia* spp. En las bacterias Gram-negativas las proteínas o moléculas liberadas por este sistema de secreción al espacio periplásmico requieren de la presencia de un polipéptido de la membrana externa (PME), lo que permitiría su paso del espacio periplásmico al exterior mediante la formación de un poro hidrofílico (Fig. 2.12). En estas bacterias, las proteínas secretadas por este sistema carecen generalmente de “secuencia líder” en su región N-terminal (Fernández y de Lorenzo, 2001), salvo la colicina V que posee una secuencia señal del tipo “doble glicina” (Håvarstein y col., 1994).

En base a sus características funcionales, los transportadores-ABC pueden clasificarse en los siguientes grupos (Dassa y Bouige, 2001):

- “Importadores”: son transportadores específicos de procariotas cuya función es proveer de nutrientes esenciales a las bacterias, incluso si éstos se encuentran en pequeñas concentraciones en el medio extracelular. Este tipo de transportadores requieren la presencia de una proteína de unión al sustrato para que el transporte sea eficaz. Esta proteína se localiza en el periplasma de las bacterias Gram-negativas mientras en las Gram-positivas es una lipoproteína de superficie. Los cuatro dominios de los que se componen estos transportadores actúan como péptidos independientes. Dentro de este grupo se incluyen las subfamilias de proteínas LAI y BAI, aparentemente no involucradas en la importación, pero relacionadas, respectivamente, con procesos de inmunidad frente a los antibióticos y a otras bacteriocinas no modificadas posttraduccionalmente.
- “Exportadores”: son los responsables de la secreción de sustancias nocivas, de toxinas extracelulares y de la distribución de distintos compuestos de la membrana, tanto en

procariotas como en eucariotas. En las bacterias estos transportadores se encargan de la secreción de sustancias (Cintas y col., 2001; Gutiérrez, 2005) como: (i) antibióticos y compuestos no proteicos; (ii) precursores peptídicos sintetizados con una extensión N-terminal del tipo “secuencia líder”, como la colicina V y la mayoría de la bacteriocinas sintetizadas por las BAL; (iii) péptidos que carecen de extensión N-terminal, como por ejemplo, la hemolisina α de *E. coli*, la enterocina EJ97, la aureocina A70 y la bacteriocina LsbB y, probablemente, las enterocina L50 (EntL50A y EntL50B), y (iv) compuestos anfífilos implicados en fenómenos de resistencia a fármacos. Estos transportadores, además de los cuatro dominios que suelen fusionarse formando un único complejo polipeptídico, necesitan de una proteína accesoria y de una proteína de la membrana externa para ser funcionales en las bacterias Gram-negativas. Las subfamilias LAE y BAE, responsables del procesamiento y transporte de los lantibióticos y de las bacteriocinas no modificadas posttraduccionalmente, se encuentran dentro de este tipo de transportadores.

- (c) “Reguladores”: son los encargados de la regulación de procesos celulares como la reparación del ADN, la traducción de proteínas o la expresión de diversos genes. Dichos reguladores carecen de dominios TMD.

II.2.2. RUTA GENERAL DE SECRECIÓN (GSP) O SISTEMA SEC-DEPENDIENTE

La ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente constituye la principal ruta de translocación de proteínas a través de la membrana citoplasmática en las bacterias. Los péptidos o proteínas que utilizan esta ruta se sintetizan como precursores o preproteínas con una extensión N-terminal del tipo “péptido señal” (SP, del inglés “*Signal Peptide*”) (Pugsley, 1993; Driessen y col., 1998, 2002; Casaus, 1998; Herranz, 2000; Gutiérrez, 2005) y las proteínas se procesan, transportan y secretan a través de la membrana citoplasmática mediante un complejo proteico denominado translocasa. Las preproteínas pueden dirigirse directamente a la translocasa conducidas por chaperonas moleculares como la SecB a través de una ruta en la que interviene la partícula reconocedora de señal (SRP, del inglés “*Signal Recognition Particle*”) (Fekkes y Driessen, 1999; van Wely y col., 2001). La mayoría de las características del sistema descrito a continuación hacen referencia a *E. coli* puesto que su translocasa bacteriana es la más estudiada, aunque se han descrito sistemas homólogos en *Bacillus subtilis*, en células eucariotas y en arqueobacterias (Pöhlschroder y col., 1997; van Wely y col., 2001; Van der Sluis y Driessen, 2006; Driessen y Nouwen, 2008; Natale y col., 2008).

Tabla II.5. Secuencia aminoacídica de los péptidos señal de algunas bacteriocinas secretadas mediante la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente

Bacteriocin	Amino acid sequence ^a
	↓
Acidocin B	MVTKYGRNLGLSKVELFAIWAVLVALLATA NIYWI
Divergicin A	MKKQILKGLVIVVCLSGATFFSTPQQASA AAPKI
Bacteriocin 31	MKKKLVICGIIIGIFTALGTNVEA ATYYG
Enterocin P	MRKKLFSALIGIFGLVVTNFGTKVDA ATRSY
Lactococin 972	MKTKSLVLALSAVTLFSAGGIVAQA EGTWQ
Enterocin SE-K4	MKKKLVKGLVICGMIGIFTALGTNVEA ATYYG

^a Indicado con una flecha se muestra la secuencia del péptido señal y los primeros cinco residuos después del punto de corte o procesamiento. Fuente: Herranz y Driessen (2005).

Para asegurar una correcta aproximación y translocación a través de la membrana celular, los péptidos o proteínas son sintetizados con un péptido señal (SP) que es eliminado o procesado proteolíticamente por peptidasas señal durante o poco después de la translocación (van Wely y col., 2001). Los péptidos señal son extensiones de 18-30 aminoácidos que, aunque no manifiestan homologías en su secuencia primaria (Casaus, 1998; Fekkes y Driessen, 1999; Herranz, 2000; Driessen y van der Does, 2002; Gutiérrez, 2005) (Tabla II.5), poseen tres dominios característicos con propiedades físico-químicas comunes:

- (1) Dominio N: consta de 1-5 aminoácidos y posee una carga neta positiva que es mayor en los SP de las bacterias Gram-positivas. El dominio N interacciona con la proteína SecA, proteína que interviene en el mecanismo de translocación proteica, y con los fosfolípidos de carga negativa de la membrana, por lo que se considera importante para la entrada de las preproteínas en la ruta de translocación. Las preproteínas cuyo dominio N no posee una carga positiva son reconocidas por la translocasa, pero su transporte es mucho más lento. Además, se sabe que cuanto mayor es la carga neta positiva los requerimientos de SecA para la translocación son menores, mientras que la interacción con SecA aumenta.
- (2) Dominio H: compuesto por 7-15 aminoácidos de naturaleza hidrofóbica, constituye la parte más importante del SP puesto que determina la eficiencia de la translocación, de tal forma que cuanto mayor sea su longitud y su hidrofobicidad mayor será la eficiencia de translocación de la proteína. Esta estructura puede adoptar conformaciones en α -hélice que se extienden hasta el dominio N. Frecuentemente hacia la mitad de esta región se localiza un residuo de glicina o prolina que rompe la estructura de hélice- α de la zona favoreciendo que el SP adopte una estructura similar a una "horquilla", lo que le permite insertarse en la capa lipídica.
- (3) Dominio C: región de carácter polar e integrada por 3-7 aminoácidos que constituye la única zona del SP que necesita cierta especificidad en su estructura primaria puesto que contiene el sitio de corte de la peptidasa señal que va a hidrolizar el SP cuando éste comienza a separarse de la membrana plasmática, permitiendo la liberación de la proteína madura. Las peptidasas señal poseen especificidad por los aminoácidos situados en posición -1 y -3 con respecto al inicio de la parte madura de la proteína; estas posiciones son generalmente ocupadas por aminoácidos de cadenas laterales cortas y neutras, como la alanina, glicina, serina o treonina. *E. coli* posee dos tipos de peptidasas líder, las de tipo I que actúan sobre preproteínas y, las de tipo II, que lo hacen sobre lipoproteínas.

Solamente algunas bacteriocinas como la acidocina B (Leer y col., 1995), la divergicina A (Worobo y col., 1995), la bacteriocina 31 (Tomita y col., 1996), la enterocina P (Cintas y col., 1997; Herranz y Driessen, 2005), la lactococina 972 (Martínez y col., 1999), la enterolisina A (Nilsen y col., 2003), la enterocina SE-K4 (Doi y col., 2002) y la propionicina T1 (Brede y col., 2005) y la enterococina V583 (Swe y col., 2007) se sintetizan con extensiones N-terminales que codifican un péptido señal (SP) reconocido por la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente. Una vez que la preproteína se sintetiza en el ribosoma, se dirige a la translocasa donde tiene lugar su procesamiento, transporte y secreción a través de la membrana citoplásmica para la liberación final de la proteína madura. Una proteína sintetizada en el ribosoma puede ser dirigida a la translocasa de dos maneras diferentes: co-traduccionally o post-traduccionally.

II.2.2.1. Modelo co-traduccional

Este modelo se describió por primera vez en la translocación de las preproteínas al retículo endoplásmico de las células eucariotas, aunque posteriormente se ha descrito tanto en eucariotas como en procariotas (Driessen y van der Does, 2002), siendo sus componentes principales la partícula reconocedora de señal (SRP) y su receptor FtsY. En este modelo, la SRP se une a la preproteína naciente antes de que se haya sintetizado totalmente en el ribosoma (Fig. 2.13.1).

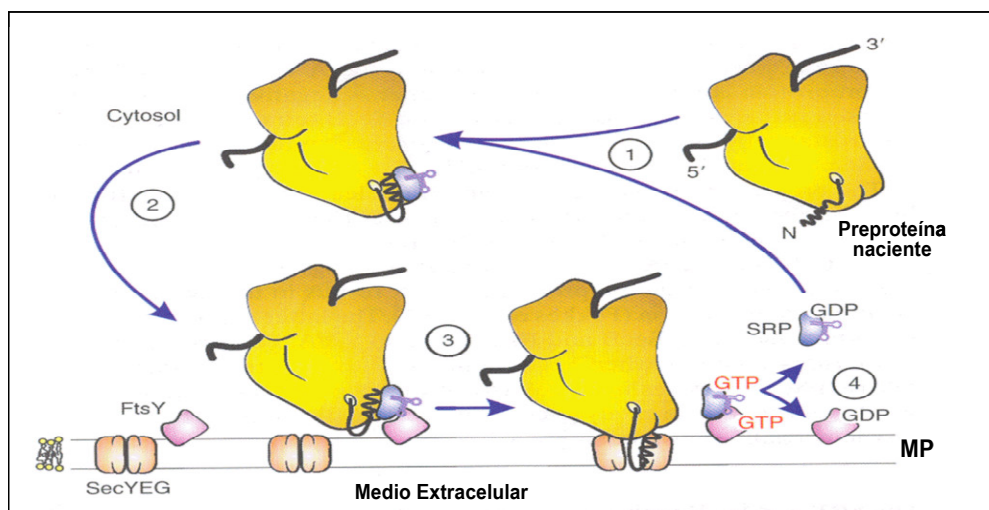


Fig.2.13. Modelo co-traduccional. En este modelo la preproteína naciente es dirigida a la translocasa por la proteína reconocedora de señal (SRP). Las etapas de este modelo se describen en el texto. MP: membrana citoplasmática. Fuente: Driessen y van der Does (2002).

La proteína de reconocimiento (SRP) está constituida por tres dominios funcionales: dominios N, G y M. El dominio M se une al ARN del ribosoma, mientras que los otros dos dominios interaccionan con las regiones hidrofóbicas del SP de la preproteína. Además, el dominio G interviene también en la actividad GTPasa. El complejo ribosoma-precursor-SRP se une a un receptor específico de la membrana para SRP (FtsY) que interacciona con la translocasa (Fig. 2.13.2 y 3) (Driessen y van der Does, 2002). Finalmente, la unión de GTP y su subsiguiente hidrólisis, libera la SRP de su receptor y del complejo ribosoma-proteína naciente, dejándola libre en el citoplasma (Fig. 2.13.4).

II.2.2.2. Modelo post-traduccional

En la segunda ruta o vía post-traduccional (Fig. 2.14), la preproteína una vez sintetizada por el ribosoma se asocia directamente a la translocasa o es conducida hasta ella por la proteína SecB (chaperona citosólica que, hasta ahora, sólo se ha descrito en bacterias Gram-negativas). Esta proteína se une de forma no selectiva a la zona madura de los precursores retardando su plegamiento y evitando su agregación manteniéndolos, de este modo, en un estado competente para su translocación. Cuando SecB se une a la membrana citoplasmática, posee una gran afinidad por SecA, lo que favorece el movimiento rápido y específico de los precursores proteicos hacia la membrana y su interacción con SecA (Herranz, 2000; Driessen y col., 2002).

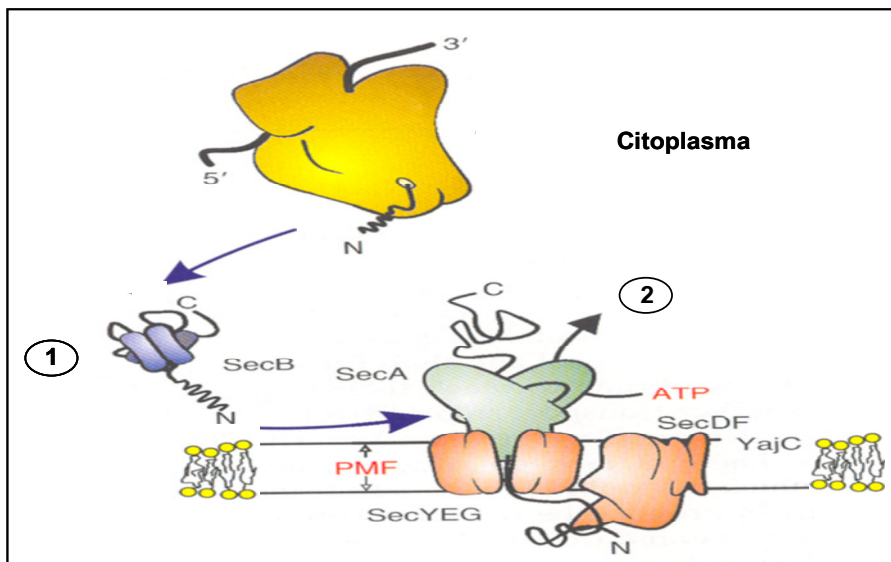


Fig. 2.14. Modelo post-traduccion. Una vez sintetizada la preproteína por el ribosoma, se asocia directamente a la translocasa, o bien es dirigida hasta el complejo de translocación por la chaperona SecB (1). Una vez allí, la translocación de la preproteína a través del complejo de membrana SecYEG requiere de la hidrólisis de ATP mediada por SecA (2). Fuente: Driessen y van der Does (2002).

II.2.2.3. Mecanismo de translocación

Una vez se produce el acercamiento a la translocasa de la proteína o preproteína sintetizada en el ribosoma, bien sea mediante el modelo co-traduccion o post-traduccion, va a tener lugar la translocación de dicha proteína o preproteína. En dicho mecanismo van a intervenir la proteína SecA y la translocasa o complejo proteico de membrana.

La SecA es una proteína con actividad ATPasa que desempeña un papel central en el mecanismo de translocación proteica al interconectar la hidrólisis del ATP con la translocación del precursor proteico a través de la membrana plasmática (van Wely y col., 2001; Driessen y van der Does, 2002, Driessen y Nouwen, 2008). La SecA se encuentra unida al complejo proteico de membrana y posee gran afinidad por SecB, SP y la región madura de las preproteínas. Esta proteína con actividad ATPasa funciona como un homodímero en el que cada uno de sus monómeros está constituido por dos regiones de unión a nucleótidos (NBS, del inglés "Nucleotide-Binding Sites"): NBS1 y NBS2. El NBS1 se localiza en el dominio N y posee una elevada afinidad por el ATP mientras el NBS2 se sitúa en el dominio C y es el encargado de controlar la hidrólisis del ATP en el NBS1 (Sianidis y col., 2001). La unión del precursor proteico a SecA estimula el intercambio de ADP por ATP en uno de sus dos sitios de unión al ATP y origina la inserción de SecA y de parte del precursor en la membrana. La hidrólisis del ATP permite la desinserción de SecA, así como la liberación de la preproteína y su entrada en la ruta de translocación (Herranz, 2000).

La translocasa o complejo proteico de membrana es un dominio hexamérico compuesto por los polipéptidos SecY, SecE, SecG, SecD, SecF y YajC. Las subunidades SecY y SecE son esenciales para el proceso de translocación y constituyen el núcleo de la translocasa. Sin embargo, *in vivo*, la SecYE se une a otra proteína de membrana de pequeño tamaño, SecG, que

no es esencial pero incrementa considerablemente la eficiencia del complejo de translocación SecYE (Driessen y col., 1998; Driessen y van der Does, 2002; Driessen y Nouwen, 2008). El complejo SecYE podría actuar como un poro de conducción de preproteínas a través de la membrana plasmática. El SecYEG puede asociarse a otro complejo heterotrimérico, SecDFYajC, cuya función no se conoce con exactitud, aunque se sabe que incrementa notablemente la eficiencia de la reacción de translocación. Con respecto a sus posibles funciones se ha observado que las células que no poseen SecD y SecF no mantienen la fuerza protón motriz durante el proceso de translocación (Arkowitz y Wickner, 1994). Los resultados de Duong y Wickner (1997) determinaron que este complejo regula los ciclos de inserción-desinserción de SecA en la membrana e impiden el movimiento retrógrado de la preproteína a través del canal de translocación. El mecanismo mediante el cual tiene lugar la translocación proteica a través de la membrana citoplásmica se muestra en la Figura 2.15. El mecanismo de translocación proteica no es un proceso espontáneo sino que requiere energía. Las principales fuentes de energía son la hidrólisis del ATP, que es esencial para los ciclos de inserción-desinserción de SecA en la membrana, y la fuerza protón motriz (PMF), que se encarga de suministrar energía en las etapas finales del proceso de translocación. Como se observa de la Figura 2.15.1, las preproteínas sintetizadas a nivel ribosomal se dirigen al complejo de translocación directamente o bien guiadas por la SRP o por una chaperona como la SecB. Inicialmente, la proteína SecA y la preproteína se asocian con el complejo SecYEG de la membrana. La unión de la preproteína origina el cambio del ADP por ATP; seguidamente SecA sufre un cambio conformacional que propicia la interacción de alguno de sus dominios en la membrana y la subsiguiente translocación del SP y de parte de la proteína madura (Fig. 2.15.2). La reversión del cambio conformacional de SecA y su desinserción de la membrana originados por la hidrólisis del ATP favorecen la liberación de la preproteína en el interior del canal de translocación (Fig. 2.15.3). En ese momento la SecA-ADP puede unirse de nuevo a la preproteína induciendo la translocación de un segmento de 2-2,5 kDa (Fig. 2.15.4). Esta unión de SecA a la proteína estimula el cambio conformacional de SecA favoreciendo la translocación de otros 2-2,5 kDa de la proteína (Fig. 2.15.5 y 6). Cuando la SecA no se encuentra asociada a la preproteína, la PMF puede originar la translocación de segmentos de tamaño desconocido del precursor proteico.

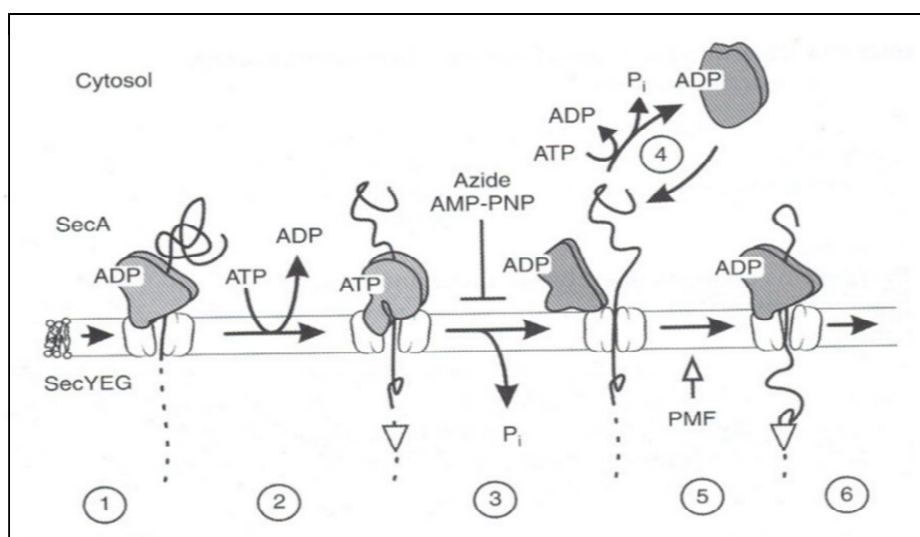


Fig. 2.15. Mecanismo de translocación de proteínas Sec-dependientes. Las etapas del proceso se describen en el texto. Fuente: Driessen y van der Does (2002).

II.3. PROCESAMIENTO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN LEVADURAS

En general, las proteínas sintetizadas por levaduras que desempeñan su función en el medio extracelular son procesadas, transportadas y secretadas mediante la ruta general de secreción (GSP) ó sistema Sec-dependiente. Inicialmente, las proteínas con un "péptido señal" son dirigidas hasta la membrana del retículo endoplasmático (RE) por las proteínas de reconocimiento del tipo SRP (sección II.2.2). Una vez que alcanzan la membrana del RE, las proteínas la atraviesan a través del complejo de translocación y, posteriormente, se procede a su transporte desde el RE hasta el aparato de Golgi (AG). Una vez alcanzado el AG, las proteínas se incorporan a unas "vesículas de secreción" que se fusionan con la membrana citoplasmática, para que las proteínas lleguen al medio extracelular (Ward, 1999) (Figura 2.16.A).

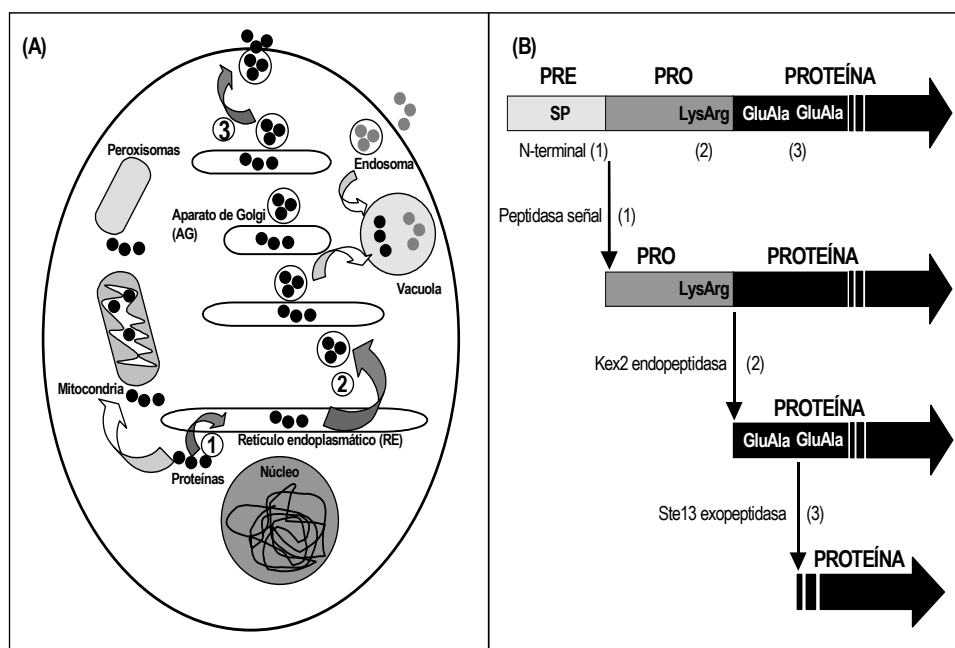


Figura 2.16. (A) Procesamiento, transporte y secreción de proteínas en levaduras. Las preproteínas se dirigen hasta la membrana del RE con la ayuda de proteínas de reconocimiento (1). Una vez alcanzan su membrana, la cruzan mediante un complejo de translocación. Posteriormente, las preproteínas alcanzan el AG, donde son incorporadas a vesículas de secreción (2). Finalmente, las vesículas de secreción se fusionan con la membrana citoplasmática para que las proteínas se liberen al medio exocelular (3). No obstante, las proteínas citoplasmáticas pueden utilizar rutas alternativas (indicadas con flechas blancas). **(B) Reconocimiento del péptido señal y lugar de procesado de la feromona factor α de *Saccharomyces cerevisiae*.** Fuente: Gutiérrez (2005).

Diversas secuencias aminoacídicas consideradas como "péptido señal" (SP) y procedentes de proteínas sintetizadas por levaduras se han evaluado por su posible utilidad como "señales" de procesado y secreción en diversos vectores de expresión (Cereghino y Cregg, 2000). En este contexto, el péptido señal de la feromona factor α (α MF, del inglés "Alpha Mating Factor") de *Saccharomyces cerevisiae* se ha convertido en una de las secuencias más utilizadas para la producción heteróloga de proteínas en levaduras (Cregg y col., 1993). El factor α es una preproteína con 3 lugares de reconocimiento para su procesamiento, transporte y secreción. Como se observa en la Figura 2.16, los lugares de reconocimiento de su extremo N-terminal incluyen: (i) un péptido señal; (ii) una zona reconocida por endopeptidasas; y (iii) una zona reconocida por exopeptidasas. Inicialmente, el SP del extremo N-terminal de la preproteína

de secreción es reconocido por proteínas de reconocimiento e incorporada al interior del RE (Fig. 2.16.B.1) donde se produce la separación del SP por la intervención de una peptidasa señal. Cuando la proproteína llega al AG, se realiza la separación del extremo N-terminal del resto de la proteína, interviniendo para ello endopeptidasas que reconocen a los residuos contiguos lisina-arginina (Fig. 2.16.B.2). Finalmente, en el momento de su secreción, la proteína es hidrolizada por exopeptidasas que reconocen el lugar de procesamiento constituido por la repetición de dos aminoácidos contiguos ácido glutámico-alanina (Fig. 2.16.B.3).

II.4. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas han recibido una atención especial debido a su posible utilización como péptidos antimicrobianos o aditivos antimicrobianos naturales de los alimentos. Sin embargo, en muchas ocasiones, la utilidad de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios se encuentra limitada por factores como:

1. La consideración de la cepa productora como microorganismo GRAS o con la Presunción Cualificada de Seguridad (QPS) (EFSA, 2007).
2. La ausencia de protocolos de purificación que permitan rendimientos de recuperación aceptables
3. La escasa adaptación de la cepa bacteriocinogénica a los sustratos alimentarios de interés.

Por ello, la producción heteróloga de bacteriocinas en otros hospedadores podría constituir una alternativa válida para evitar algunas de las situaciones previamente citadas. En este sentido, la producción de bacteriocinas en dichos hospedadores permitiría:

- (a) Incrementar la producción de bacteriocinas.
- (b) Producirlas en hospedadores más seguros.
- (c) Construir cepas multibacteriocinogénicas productoras de varias bacteriocinas.
- (d) Mejorar la adaptación de los hospedadores seleccionados para su implantación y desarrollo en diversos sustratos alimentarios.
- (e) Proveer de una actividad antagonista, mayor o más específica, a bacterias lácticas utilizadas como cultivos iniciadores, protectores o probióticos de los alimentos.
- (f) Facilitar el estudio funcional de las proteínas implicadas en la biosíntesis de las bacteriocinas.

Por lo tanto, no es de extrañar que el estudio y evaluación de la clonación, producción heteróloga y expresión funcional de las bacteriocinas en otros hospedadores sea de un gran interés científico y aplicado. Sin embargo, el diseño de un sistema de producción y expresión eficaz de proteínas o péptidos recombinantes depende de numerosos factores, entre los que se incluyen (Makrides, 1996):

- I. Las características del hospedador.
- II. Los elementos genéticos utilizados, como vectores de expresión, promotores, lugares de unión al ribosoma y señales de transcripción y traducción.

- III. La existencia o no de modificaciones postraduccionales.
- IV. La producción, expresión funcional y localización del producto final.
- V. La ausencia de efectos tóxicos del producto final, tanto en el hospedador que lo produce como en el producto purificado a homogeneidad.

La producción de bacteriocinas en hospedadores heterólogos se basó inicialmente en la clonación de los genes responsables de la síntesis de la bacteriocina de interés en vectores de expresión (Marugg y col., 1992; Chikindas y col., 1995; O'Keeffe y col., 1999). No obstante, el reconocimiento de que la región N-terminal de la secuencia líder de muchas pre-probacteriocinas manifiesta una elevada homología entre ellas, ha conducido a la hipótesis de que sus sistemas de procesamiento y secreción podrían ser homólogos e intercambiables (Allison y col., 1995a; van Belkum y col., 1997). De hecho, otra alternativa experimental que merece una atención especial es la basada en la posibilidad de utilizar la ruta general de secreción (GSP) ó sistema Sec-dependiente en lugar del sistema dedicado de transporte (DTS) mediante la sustitución de la secuencia señal del tipo "doble glicina" de la bacteriocina de interés por un péptido señal (SP), lo que podría conducir a un sistema generalizado de procesamiento, transporte y secreción de las bacteriocinas.

II.4.1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS EN BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas constituyen una buena elección para la producción heteróloga de bacteriocinas ya que en muchos casos son consideradas como seguras (GRAS) y, por ello, como biorreactores apropiados para la producción heteróloga de proteínas y péptidos antimicrobianos de interés en los alimentos. En este sentido, destacan las cepas de *L. lactis* de origen lácteo de gran utilización experimental debido a que poseen características que favorecen su empleo como hospedadores para la producción heteróloga de péptidos y proteínas recombinantes, como son: (i) la secuenciación completa de su genoma y conocimiento profundo de su fisiología (Konings y col., 2000); (ii) la variedad de herramientas genéticas desarrolladas para trabajar con estas cepas (de Vos, 1999); (iii) su baja actividad proteolítica; (iv) el reducido número de proteínas secretadas entre las que destaca la proteína Usp45 (del inglés "*Unknown Secreted Protein of 45 kDa*") y (v) la ausencia de plásmidos (Johansen, 2003; Nouaille y col., 2003; le Loir y col., 2005). Las estrategias de producción de bacteriocinas empleando como hospedadores a diversas BAL se han basado en la expresión de sus genes nativos o en el intercambio de secuencias líder y/o de los sistemas de procesamiento, transporte y secreción de unas bacteriocinas con otras. A continuación, se realiza una breve descripción de la producción heteróloga de bacteriocinas empleando ambas estrategias.

II.4.1.1. Producción heteróloga basada en la expresión de genes nativos

La utilización de los genes implicados en la síntesis, procesamiento, transporte y secreción de bacteriocinas constituye el procedimiento más sencillo para su producción en otros hospedadores. De hecho, ésta ha sido la estrategia seguida para la clonación, producción y secreción de numerosas bacteriocinas de distintas clases y subclases en otras BAL. La mayoría de los estudios realizados acerca de la producción heteróloga de bacteriocinas se han basado en el empleo de bacteriocinas de la clase II, aunque también se han desarrollado trabajos con

bacteriocinas de otras clases. Este es el caso de la nisina A, la lacticina 3147 y de la lactocina S pertenecientes a la clase I, así como la helveticina J de *Lb. helveticus* 481 (Joerger y Klaenhammer, 1986) del grupo de las bacteriolisinas. En el caso de ésta última, los mencionados investigadores introdujeron el plásmido pTRK135 con el gen estructural de la helveticina J en *Lb. johnsonii* NCK64 y, aunque sólo se consiguió la producción y expresión funcional de la bacteriocina en medio sólido, éste constituyó el primer trabajo publicado de producción heteróloga de una bacteriocina sintetizada por BAL. El principal inconveniente para la producción heteróloga de bacteriocinas de la clase I o lantibióticos es el tamaño y la complejidad del material génico que ha de transferirse al hospedador para su correcto procesamiento, transporte y secreción. Recordemos que estas bacteriocinas, para que sean activas, deben sufrir modificaciones posttraduccionales que requieren una maquinaria génica específica (ver Fig. 2.5). En este sentido, Broadbent y col. (1995) intentaron producir la nisina A en bacterias lácticas diferentes a las productoras naturales de esta bacteriocina, para lo que transfirieron el transposón Tn5307 de *L. lactis* ATCC 11454 al enterococo de origen lácteo *Enterococcus* sp. S12 β . El elemento genético Tn5307 es un transposón conjugativo que posee los determinantes requeridos para la síntesis de la Nis A y que se transfiere de unas BAL a otras sin necesidad de utilizar técnicas sofisticadas de transferencia genética. Dichos investigadores obtuvieron la cepa transconjugante *Enterococcus* sp. N12 β que manifestaba inmunidad frente a la nisina A y, sin embargo, no la secretaba al medio extracelular. No obstante, los transconjugantes generados secretaron nisina A al medio extracelular cuando se adicionó nisina A purificada en el medio de cultivo, aunque la cantidad necesaria para inducir su secreción fue significativamente mayor que en las cepas salvajes de *L. lactis* productoras de NisA (Li y O'Sullivan, 2002). Por otro lado, Skaugen y col. (1999) clonaron un fragmento de 16 kb con los dos operones completos de la lactocina S (LacS) en el vector de expresión pELS100, y la transformación de cepas de *Lb. sakei* y *Lb. plantarum* con este plásmido recombinante resultó en la producción y expresión funcional de LacS en ambos microorganismos. Por su parte, Ryan y col. (1999) intentaron la producción heteróloga de la lacticina 3147 de *L. lactis* 3147 mediante la transformación directa de *E. faecalis* FA2-2 con un plásmido conjugativo que codificaba los dos operones necesarios para la biosíntesis de la lacticina 3147. Aunque la nueva construcción permitió la producción heteróloga del lantibiótico, la actividad antimicrobiana del transconjugante obtenido fue menor que la del lactococo productor de la lacticina 3147.

Como se ha mencionado anteriormente, las bacteriocinas de la clase II han focalizado la mayoría de los estudios realizados sobre producción heteróloga de bacteriocinas, entre los que destacan los referidos a la pediocina PA-1 (PedA-1), probablemente por su potente actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y otros patógenos de los alimentos. En este contexto, la clonación, producción, transporte y secreción de la PedA-1, producida por cepas de *P. acidilactici* de diversos orígenes, en otras BAL de origen alimentario ha constituido un objetivo a seguir por muchos investigadores. Así, Venema y col., (1995) clonaron el operón completo de la PedA-1 (operón *ped*), incluyendo su propio promotor, en *P. pentosaceus* PPE1.2. La producción heteróloga de la PedA-1 en este hospedador, una cepa originalmente sensible a dicha bacteriocina, permitió el análisis funcional del operón *ped*. También Chikindas y col., (1995) consiguieron producir la PedA-1 en *P. pentosaceus* PPE1.2., aunque, en este caso, mediante la utilización de un plásmido (pMC117) que contenía el promotor lactocócico P₃₂ (van der Vossen y col., 1987) en lugar del promotor de la PedA-1. Posteriormente, Coderre y Somkuti (1999)

utilizaron un vector de expresión con el operón *ped* bajo el control del promotor ST_{P2201} para la producción heteróloga de la PedA-1 en *L. lactis*, *E. faecalis* y *S. thermophilus*.

No obstante, los trabajos relacionados con la producción heteróloga de bacteriocinas de la clase II en otras BAL no sólo incluyen a la pediocina PA-1. Así, la transferencia de pCV461, un plásmido que codifica la biosíntesis de la acidocina B de *Lb. acidophilus* M46, permitió la producción heteróloga de esta bacteriocina en *Lb. plantarum* (van der Vossen y col., 1994). Un año más tarde, Leer y col. (1995) obtuvieron dos plásmidos derivados de pCV461, con los que se consiguió, nuevamente, la producción de acidocina B en *Lb. plantarum* y *Lb. fermentum*. Por su parte, Worobo y col., (1995) construyeron dos plásmidos recombinantes (pCD4.4 y pRW5.6) que únicamente portaban los genes estructural (*dvnA*) y de inmunidad (*dviA*) de la divergicina A (bacteriocina procesada por el sistema Sec-dependiente). La transformación de cepas de *Cb. piscicola* y *L. lactis* con cualquiera de los plásmidos citados permitió la producción de divergicina A en el sobrenadante de las cepas recombinantes. Asimismo, la clonación de todos los elementos genéticos que intervienen en la síntesis de la acidocina A de *Lb. acidophilus* TK9201, microorganismo utilizado como cultivo iniciador en la producción de leche fermentada ácida, permitió su producción en *Lb. casei* TK9008, una cepa originalmente sensible a la acidocina A (Kanatani y col., 1995).

Tabla II.6. Producción heteróloga de bacteriocinas en bacterias lácticas basada en la expresión de genes nativos

Bacteriocina	Clase	Productor nativo	Hospedador heterólogo	Referencia
nisina A	I	<i>L. lactis</i> ATCC 11454	<i>Enterococcus</i> sp. S12β	Broadbent y col., 1995 Li y O'Sullivan, 2002
lactocina 3147	I	<i>L. lactis</i> 3147	<i>E. faecalis</i> FA2-2	Ryan y col., 1999
lactocina S	I		<i>Lb. sakei</i> <i>Lb. plantarum</i>	Skaugen y col., 1999
helveticina J	Btl	<i>Lb. helveticus</i> NCDO481	<i>Lb. johnsonii</i> NCK64	Joerger y Klaenhammer, 1986
pediocina PA-1	Ila	<i>P. acidilactici</i> PAC 1.0	<i>P. pentosaceus</i> PPE1.2 <i>P. pentosaceus</i> PPE1.2 <i>L. lactis</i> subesp. <i>lactis</i> IL1403 <i>L. lactis</i> subesp. <i>lactis</i> LL108 <i>L. lactis</i> ML3 <i>E. faecalis</i> DL3 <i>S. thermophilus</i> ST128	Venema y col., 1995 Chikindas y col., 1995 Corderre y Somkuti 1999
acidocina B	Ild	<i>Lb. acidophilus</i> M46	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. fermentum</i>	van der Vossen y col., 1994 Leer y col., 1995
divergicina A	Ild		<i>Cb. piscicola</i> <i>L. lactis</i>	Worobo y col., 1995
acidocina A	Ila	<i>Lb. acidophilus</i> TK9201	<i>Lb. casei</i> TK9008	Kanatani y col., 1995
enterocina A	Ila	<i>E. faecium</i> DPC1146	<i>E. faecalis</i> OG1X <i>L. lactis</i> subesp. <i>lactis</i> IL1403	O'Keefe y col., 1999
mundticina KS	Ila	<i>E. mundtii</i> NFRI 7393	<i>E. faecium</i> IFO13712 <i>Lb. Curvatus</i> JCM1096 <i>L. lactis</i> subesp. <i>lactis</i> IL1403	Kawamoto y col., 2002
bacteriocina ABP-118	Ilb	<i>Lb. salivarius</i> subesp. <i>salivarius</i> UCC118	<i>Lb. Plantarum</i> NCIMB 8826 <i>L. lactis</i> subesp. <i>lactis</i> IL1403 <i>B. cereus</i> ATCC 14579 ^b	Flynn y col., 2002
propionicina T1*	II	<i>Propionibacterium thoenii</i> 419 ^b	<i>P. freudenreichii</i> IFO12426 ^b	Brede y col., 2005
PAMP* ^a		<i>Propionibacterium jensenii</i> LMG 3032 ^b	<i>P. freudenreichii</i> IFO12426 ^b	Brede y col., 2005
enterocina P	Ila	<i>E. faecium</i> P13	<i>L. lactis</i> subesp. <i>lactis</i> IL1403 <i>L. lactis</i> subesp. <i>Lactis</i> DPC5598 <i>L. lactis</i> subesp. <i>cremoris</i> NZ9000	Gutiérrez y col., 2006
circularicina A	Ilc	<i>Clostridium beijerinckii</i> ATCC	<i>E. faecalis</i> JH2-2	Kemperman y col., 2003b

^a Péptido Antimicrobiano Activado por Proteasa. ^b No son BAL, sino BAP (bacterias productoras de ácido propiónico). Btl: bacteriolisina.

O'Keefe y col., (1999) transformaron células competentes de *E. faecalis* y *L. lactis* con los plásmidos recombinantes pENT02 y pENT03. El plásmido pENT02 se construyó mediante la clonación en pMG36e de los genes estructural (*entA*), de inmunidad (*entIA*) y de transporte (*entTD*) de la enterocina A (EntA), mientras que pENT03 fue obtenido tras la incorporación de los genes requeridos para la biosíntesis de la EntA en un vector de expresión con replicación en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (pCI372). La introducción de pENT03 en *E. faecalis* permitió la producción de la EntA en medio sólido y líquido aunque, en este último, fue necesaria la adición del factor de inducción al medio de cultivo. La transformación de *L. lactis* con pENT03 no se tradujo en una actividad bacteriocinogénica detectable, incluso en medios que contenían el factor de inducción. No obstante, la transformación de ambas cepas con el plásmido pENT02 permitió la producción y expresión funcional de la EntA en ambos hospedadores.

Kawamoto y col., (2002) construyeron un plásmido recombinante (pRK1) que portaba los genes responsables de la biosíntesis de la munticina KS de *E. mundtii* NFRI 7393 (gen estructural, de transporte y de inmunidad). La transformación de células competentes de *E. faecium*, *Lb. curvatus* y *L. lactis* con pRK1 se tradujo en una producción de munticina KS biológicamente activa que fue comparable a la de la cepa silvestre de *E. mundtii* NFRI 7393. Al mismo tiempo, Flynn y col., (2002) clonaron el operón de la bacteriocina ABP-118 de *Lb. salivarius* UCC118 en el vector de expresión pNZ8048 y consiguieron la producción y expresión funcional de dicha bacteriocina en los sobrenadantes de *Lb. plantarum* NCIMB 8826 y *L. lactis* IL1403, así como de *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Recientemente, Gutiérrez y col., (2006) han demostrado que la clonación del gen que codifica la enterocina P (*entP*) así como de los genes estructurales y de inmunidad (*entP* y *entIP*) en los vectores de expresión de promotor constitutivo (pMG36c y pINT29) y de promotor inducible (pNG8048e), y la posterior transformación de cepas de *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403 y DPC5598 y de *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 con los plásmidos recombinantes resultantes, permiten la producción de EntP en cantidades variables en función de: (a) la subespecie de *L. lactis* empleada como hospedador; (b) el sistema de expresión empleado (constitutivo o inducible); (c) el fragmento de clonación (el gen estructural sólo, o el gen estructural más el de inmunidad) y (d) la producción de EntP conjuntamente con otras bacteriocinas, en este caso la nisina A. La mayor producción de EntP se obtuvo en las cepas *L. lactis* IL1403 (pJP214) y *L. lactis* NZ9000 (pJR199), que produjeron 5-6 veces más enterocina P que la cepa salvaje *E. faecium* P13. Las células competentes de *L. lactis* DPC5598 transformadas con distintos vectores de expresión también permitieron la co-producción simultánea de NisA y EntP.

También se han realizado experiencias de expresión heteróloga con bacteriocinas de la clase IIc, o bacteriocinas cíclicas, como la circularicina A de *Clostridium beijerinckii* ATCC 1123 (Kemperman y col., 2003a). En el vector de expresión de promotor constitutivo pMG36c se insertó la mínima región necesaria para la producción, procesamiento, secreción y circularización de la circularicina A (*cirABCDE*), además de su gen de inmunidad, obteniendo el plásmido recombinante pMGAE1. La transformación de células competentes de *E. faecalis* JH2-2 con pMGAE1 permitió la producción de pequeñas cantidades de la circularicina A en el sobrenadante de las células recombinantes (Kemperman y col., 2003b).

La producción heteróloga de bacteriocinas no es exclusiva de las bacterias lácticas, ya que también se han realizado experiencias similares con otras bacterias Gram positivas. De hecho, recientemente se ha descrito la producción heteróloga de bacteriocinas en *Propionibacterium freudenreichii* (Brede y col., 2005), una bacteria del grupo de las productoras de ácido propiónico (BAP) que participa en la producción de quesos tipo suizos, reconocidas por la industria alimentaria como GRAS y de gran interés como cultivos iniciadores, protectores y probióticos por su formación de ácido propiónico inhibidor de mohos y por la producción de bacteriocinas. En dicho trabajo se consiguió la producción de la propionicina T1 de *Propionibacterium thoenii* 419 en *P. freudenreichii* IFO12426 mediante la introducción del gen estructural de dicha bacteriocina (*pctA*) en el vector pAMT1 bajo el control del promotor constitutivo P₄, obteniendo una producción de bacteriocina igual a la de la cepa salvaje *P. thoenii* 419. En el mismo trabajo, el gen *pamA* que codifica el péptido antimicrobiano activado por proteasa (PAMP, del inglés “Protease-activated Antimicrobial Peptide”) descrito por primera vez en *Propionibacterium jensenii* LMG 3032 (Faye y col., 2002), fue también clonado y expresado en *P. freudenreichii* IFO12426, consiguiendo la secreción de la pro-PAMP que necesita para su activación, al igual que en la cepa nativa, la adición externa de proteasas.

II.4.1.2. Producción heteróloga basada en el intercambio de sistemas de procesamiento, transporte y secreción

El que la mayor parte de las bacteriocinas se sinteticen con extensiones N-terminales homólogas, ha conducido a la hipótesis de que sus sistemas de procesado y secreción podrían ser intercambiables. Por ello, de gran interés ha sido la producción de bacteriocinas en diferentes hospedadores mediante el intercambio de secuencias líder y/o de genes del sistema transportador-ABC o sistema de transporte dedicado (DTS) de algunas bacteriocinas, así como mediante el intercambio de secuencias líder de unas bacteriocinas por péptidos señal de otras reconocidos por la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente.

II.4.1.2.1. Producción de bacteriocinas mediante el intercambio de secuencias líder y/o de genes del sistema transportador-ABC o sistema de transporte dedicado (DTS)

La extensión N-terminal que codifica las secuencias líder de la lactacina F de *Lb. johnsonii* VPI 11088 y de las carnobacteriocinas A, BM1 y BM2 de *Cb. piscicola* LV17 muestran una gran homología. Debido a ello, Allison y col., (1995b) determinaron que el sistema de procesado, transporte y secreción de la lactacina F era homólogo al de las carnobacteriocinas A, BM1 y BM2. El plásmido pTRK386 con los genes del operón de la lactacina F se introdujo por transformación en *Cb. piscicola* LV17 consiguiendo la producción simultánea de lactacina F y de las tres carnobacteriocinas en una cepa recombinante de *Cb. piscicola*, demostrando así que la secuencia líder de la lactacina F era reconocida y procesada por el sistema de procesado y secreción de las carnobacteriocinas. No obstante, la cantidad de lactacina F producida fue inferior a la de la cepa nativa, lo que sugirió que, probablemente, los precursores de la lactacina F competían ineficazmente con los de las carnobacteriocinas por su procesado, transporte y secreción, o que existían diferencias significativas en el entorno intracelular de estos microorganismos pertenecientes a dos géneros diferentes.

De forma similar, Fremaux y col., (1995) intentaron demostrar que los sistemas de procesado y secreción de la mesentericina Y105 de *Lc. mesenteroides* y de la lactacina F de *Lb. johnsonii* eran intercambiables. Nuevamente, la producción de mesentericina Y105 en el hospedador utilizado fue pequeña, lo que posiblemente se deba, como en el caso anterior, a una menor afinidad del sistema de procesado, transporte y secreción de la lactacina F por la mesentericina Y105. Por otro lado, van Belkum y Stiles (1995) compararon los sistemas de procesado y secreción de la leucocina A de *Lc. gelidum* UAL187 y de la lactococina A de *L. lactis* WM4. La clonación del gen estructural (*lcaA*) y de inmunidad (*lcaB*) de la leucocina A en una cepa de *L. lactis* que contenía los genes necesarios para el procesado y secreción de la lactococina A no se tradujo en la producción de la leucocina A. Simultáneamente, Allison y col., (1995a) clonaron el operón de la lactacina F (*lafA*, *lafX* y *orfz*) en la cepa de *Lc. gelidum* UAL187, consiguiendo la coproducción de la leucocina A y lactacina F.

Más tarde, Franz y col., (1999b) investigaron la posibilidad de que la secuencia líder de la enterocina B de *E. faecium* BFE 900 pudiera ser reconocida por el sistema de procesamiento, transporte y secreción de la carnobacteriocina A de *Cb. piscicola* LV17A, una bacteriocina que comparte homología con la secuencia líder de la enterocina B. Efectivamente, la transformación de una cepa productora de carnobacteriocina A (*Cb. piscicola* LV17A) con un plásmido que contenía los genes estructural (*entB*) y de inmunidad (*eniB*) de la enterocina B permitió la co-producción de ambas bacteriocinas.

Casi simultáneamente, Horn y col., (1998) desarrollaron un sistema de expresión, constituido por el vector de expresión pFI2126 y el hospedador heterólogo *L. lactis* IL1403, que permitió la producción de pediocina PA-1 activa en dicho hospedador pero en cantidades menores a las del productor natural *P. acidilactici* 347. El plásmido pFI2126 contiene el promotor de la lactococina A de *L. lactis* WM4 y un gen híbrido en el que la secuencia líder de la lactococina A se fusiona a la secuencia nucleotídica de la PedA-1 madura, mientras que *L. lactis* IL1403 es una cepa que posee en su cromosoma genes análogos (*lcnC'* y *lcnD'*) a los que codifican las proteínas de procesado, transporte y secreción de la lactococina A. Posteriormente, Horn y col., (1999) incrementaron la producción de PedA-1 en *L. lactis* IL1403 mediante la construcción de un plásmido (pFI2160) que incorporaba los genes de procesamiento, transporte y secreción de la lactococina A (genes *lcnCD*) junto al gen híbrido "secuencia líder de lactococina A/ pediocina PA-1 madura", alcanzando niveles de producción similares a los de *P. acidilactici* 347. En este mismo trabajo, la transformación de *L. lactis* FI5876, una cepa productora de nisina A, con el plásmido pFI2160 permitió la co-producción de nisina A y pediocina PA-1 en la cepa recombinante de *L. lactis* FI9267. Aunque *L. lactis* FI9267 mantuvo la misma producción de nisina A que la cepa original, la producción de pediocina PA-1 fue inferior a la esperada. En base a los resultados de trabajos anteriores, Horn y col., (2004) han desarrollado un sistema de expresión que permite la producción de pediocina PA-1 y colicina V, bajo el control del promotor inducible de la nisina A (P_{nisA}), en dos cepas de *L. lactis* (FI7847 y FI5876). Este sistema consistió en la construcción de dos plásmidos, pFI2391 y pFI2436, que portaban los genes híbridos "secuencia líder de lactococina A/ pediocina PA-1 madura" y "secuencia líder de lactococina A/ colicina V madura" respectivamente, y un tercer plásmido con los genes *lcnCD* (pFI2148). Posteriormente, las células competentes de *L. lactis* FI7847 y *L. lactis* FI5876, ésta última productora de nisina A, se transformaron con las parejas de plásmidos recombinantes pFI2391/pFI2148 y pFI2436/pFI2148. La producción de pediocina PA-1 en las cepas

transformadas de *L. lactis* representó un 20-30% de la producida por la cepa de *P. acidilactici* 347, mientras que la producción de colicina V fue de un 25-35% con respecto a su producción por *E. coli* ATCC 14763. La producción de nisina A en las cepas hospedadoras se mantuvo en niveles casi idénticos a los de la cepa original. Fernández y col. (2004) han desarrollado también un sistema de expresión similar al de Horn y col. (2004) para la producción de lactococina A y nisina A bajo el control del promotor inducible de la nisina (P_{nisA}).

Por otra parte, Martínez y col., (2000a) consiguieron la producción de pediocina PA-1 y enterocina A en *L. lactis* IL1403. Para ello, se procedió a la clonación de los genes estructural (*pedA*) y de inmunidad (*pedB*) de la pediocina PA-1 en el plásmido pHB04, un plásmido recombinante derivado de pMG36c que contenía los genes estructural (*entA*) y de inmunidad (*entI*) de la enterocina A bajo el control del promotor P_{32} , obteniendo el plásmido pJM04. Además, estos autores construyeron otro plásmido recombinante (pJM03) mediante la clonación de los genes *pedA* y *pedB* en pMG36c y bajo el control del mismo promotor. La transformación de *L. lactis* IL1403 con los plásmidos pHB04 (*entA::entI*), pJM03 (*pedA::pedB*) y pJM04 (*entA::entI::pedA::pedB*) permitió la producción independiente de enterocina A y pediocina PA-1 y la co-producción de ambas bacteriocinas en una misma cepa. La producción de enterocina A y pediocina PA-1 en los sobrenadantes de *L. lactis* IL1403 (pHB04) y *L. lactis* IL1403 (pJM03) representó un 4-8% de la producida por las cepas de *E. faecium* T136 y *P. acidilactici* 347, respectivamente. La co-producción de enterocina A y pediocina PA-1 en *L. lactis* (pJM04) tampoco mejoró los niveles de producción de las dos bacteriocinas, con respecto a los de las cepas productoras silvestres. Probablemente, la baja producción de enterocina A y pediocina PA-1 por las cepas recombinantes de *L. lactis* se deba a la existencia de una sola copia de los genes *lcnC'D'* localizados en el cromosoma bacteriano y/o a que los productos de ambos genes no reconozcan eficazmente los lugares de procesamiento y secreción de la extensión N-terminal que contiene las secuencias líder de la enterocina A y de la pediocina PA-1.

Morriset y Frére (2002) también han conseguido producir heterológamente la pediocina PA-1. En este caso, dichos investigadores construyeron un vector que contenía el gen híbrido "secuencia líder de la mesentericina Y105/ pediocina PA-1 madura" y los genes del procesamiento y secreción de la mesentericina Y105 (*mesCDE*). La transformación de *Lc. mesenteroides* con el plásmido recombinante se tradujo en niveles de producción de pediocina PA-1 similares a los del pediococo original.

Por último, conviene citar el modelo de expresión desarrollado por Axelsson y col., (1998b) para la producción heteróloga de bacteriocinas en *Lb. sakei* Lb790. El modelo se basa en el empleo de los genes de síntesis, regulación transcripcional, procesamiento y secreción de la sakacina A de *Lb. sakei* Lb706 (genes *orf4sapKRTE*). Para ello, dichos investigadores transformaron la cepa de *Lb. sakei* Lb790 con dos plásmidos recombinantes. El primero de ellos (pSAK20) contenía los genes de la activación transcripcional del promotor de la sakacina A (SakA), así como los de procesamiento, transporte y secreción del precursor de la SakA, mientras que el segundo portaba los genes estructural y de inmunidad de la sakacina P de *Lb. sakei* Lb674, la pediocina PA-1 de *P. acidilactici* PAC1.0 ó la piscicolina 61 de *Cb. piscicola* LV61 bajo el control de sus propios promotores (plásmidos pSPP1, pPED1 ó pPSC1, respectivamente) o del promotor de la sakacina A (plásmidos pSPP2, pPED2 ó pPSC2, respectivamente). Además, estos autores construyeron otro plásmido recombinante (pSPP3) que portaba la fusión

“secuencia líder de la sakacina A/sakacina P madura” y el gen de inmunidad de la sakacina P por detrás del promotor de la sakacina A. La introducción de pSPP2, pSPP3, pPED2, pPSC1 y pPSC2 en *Lb. sakei* Lb790 (pSAK20) permitió la producción de sakacina P, pediocina PA-1 y piscicolina 61 en cantidades similares o incluso superiores a la producida por las cepas originales.

II.4.1.2.2. Producción de bacteriocinas mediante el intercambio de secuencias líder por péptidos señal reconocidos por la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente

Como se ha mencionado previamente, solamente unas pocas bacteriocinas como la acidocina B, la divergicina A, la bacteriocina 31, la enterocina P, la lactococina 972, la enterolisina A, la enterocina SE-K4, la propionicina T1 y la enterococina V583 se sintetizan con extensiones N-terminales que codifican un péptido señal reconocido por la ruta general de secreción (GSP) ó sistema Sec-dependiente. Así pues, dado que las bacteriocinas sintetizadas con un péptido señal (SP) no requieren genes específicos para su procesamiento, transporte y secreción, resulta de gran interés determinar si su péptido señal es reconocido por otras bacterias hospedadoras, así como si el intercambio de la secuencia líder de una bacteriocina por la del péptido señal de otra permite el procesamiento, transporte y secreción de la bacteriocina madura por componentes de la ruta general de secreción (GSP) ó sistema Sec-dependiente de los hospedadores de mayor interés.

La producción heteróloga de la divergicina A de *Cb. divergens* LV13 se demostró en cepas de *Cb. piscicola* y *L. lactis* transformadas con vectores de expresión que contenían los genes estructural (*dvnA*) y de inmunidad (*dviA*) de la divergicina A, lo que sugirió que los componentes de la ruta general de secreción de ambos hospedadores reconocían la señal de procesamiento, transporte y secreción de la divergicina A (Worobo y col., 1995). Posteriormente, McCormick y col., (1996) construyeron un vector de expresión con el péptido señal de la divergicina A fusionado a la secuencia nucleotídica de la carnobacteriocina B2 madura de *Cb. piscicola* LV17 y bajo el control del promotor P₃₂. La transformación de *Cb. divergens* LV13 (productor de divergicina A) con el plásmido recombinante resultó en la co-producción de divergicina A y carnobacteriocina B2. Asimismo, la introducción de este plásmido en *L. lactis* IL1403 permitió la producción de carnobacteriocina B2. Más tarde, McCormick y col., (1999) utilizaron la misma estrategia para la producción de la colicina V de *E. coli* en *Cb. piscicola*, *Cb. divergens* y *L. lactis*. En este caso, el gen que codifica la carnobacteriocina B2 madura fue sustituido por el que codifica la colicina V madura. De forma similar, Bohaychuk y col., (1999) produjeron la brococina C de *B. campestris* ATCC 43754 en *Cb. piscicola* y *Cb. divergens* utilizando un vector de expresión con el péptido señal de la divergicina A fusionado a los dos péptidos de la brococina C. Por otro lado, la clonación del gen híbrido “péptido señal de la divergicina A/ enterocina B madura” en el vector de expresión pMG36e y su transferencia por transformación a *E. faecalis* ATCC 19435 (Franz y col., 1999b) permitió la producción de la enterocina B por este hospedador heterólogo.

Nuevamente Biet y col., (1998) utilizaron el péptido señal de la divergicina A para la producción heteróloga de la mesentericina Y105 de *Lc. mesenteroides* Y105 en *Lc. mesenteroides* DSM20484 y *Lc. cremoris* LC, tras su transformación con un plásmido que contenía el gen híbrido “péptido señal de la divergicina A/ mesentericina Y105 madura”. En el

mismo estudio Biet y col., (1998) compararon la producción de la mesentericina Y105, bajo el control de la ruta general de secreción (GSP) ó sistema Sec-dependiente con el sistema de transporte dedicado (DTS) mediado por transportadores-ABC específicos. Para ello, células competentes de *Lc. mesenteroides* DSM20484 y *Lc. cremoris* LC se transformaron con un plásmido que poseía el operón completo de la mesentericina Y105, resultando que la producción de mesentericina Y105 bajo el control de un sistema dedicado de procesamiento, transporte y secreción fue cuatro veces mayor que la obtenida con el sistema Sec-dependiente. Como ya se consideró previamente por McCormick y col., (1996), no se comprende bien cómo la mayor parte de las bacteriocinas producidas por BAL poseen sistemas específicos de procesado y secreción (DTS) cuando acceden a la ruta general de secreción (GSP) con un péptido señal adecuado. Probablemente ello se deba a que los sistemas de procesado, transporte y secreción dedicados (DTS) parecen más eficaces que los de la ruta general de secreción (GSP) (Biet y col., 1998). No obstante, esta hipótesis procede de resultados obtenidos con el péptido señal de la divergicina A fusionado a la secuencia madura de bacteriocinas que poseen una secuencia N-terminal diferente a la de la divergicina A madura y cuyo procesamiento, transporte y secreción se realiza en hospedadores que puede que reconozcan ineficazmente su señal de procesado y secreción. Por ello, generalizar que los sistemas de procesamiento, transporte y secreción dedicados (DTS) son más eficaces que los que emplean componentes de la ruta general de secreción (GSP), por ahora, es una hipótesis no suficientemente contrastada experimentalmente.

Trabajos realizados recientemente por nuestro equipo investigador han demostrado la eficacia de la producción de la bacteriocina Sec-dependiente enterocina P (EntP), producida por *E. faecium* P13 (Cintas y col., 1997), en *E. coli* (Gutiérrez y col., 2005a), *M. extorquens* (Gutiérrez y col., 2005b), *Pichia pastoris* (Gutiérrez y col., 2005c) y *L. lactis* (Herranz y Driessen, 2005; Gutiérrez y col., 2006). Dichos trabajos demuestran el potencial de los sistemas de procesamiento, transporte y secreción Sec-dependientes para reconocer eficazmente a la EntP y permitir su procesamiento, transporte y secreción por las cepas recombinantes productoras en cantidades mayores que las producidas por la cepa control *E. faecium* P13. Efectivamente, la transformación de células competentes de *E. coli* Tuner(DE3)pLacI con los plásmidos recombinantes pJG01, que posee el gen estructural de la EntP (*entP*), y del plásmido pJG02, con los genes estructural (*entP*) y de inmunidad de la enterocina P (*entiP*), permitió la producción de EntP funcionalmente activa. Las células recombinantes de *E. coli* Tuner(DE3)pLacI (pJG01) merecen su reconocimiento como modelo experimental de producción y expresión funcional de la EntP ya que facilitan su recuperación de los sobrenadantes de los cultivos productores mediante el empleo de técnicas inmunológicas y cromatográficas sencillas y rápidas (Gutiérrez y col., 2005a). Igualmente, la clonación del gen estructural de la enterocina P (*entP*) en el vector de expresión pCM80 originó el plásmido recombinante pS25, lo que permitió la producción heteróloga de la EntP en *M. extorquens* ATCC 55366. Sin embargo, dicha bacteriocina no mostró actividad antimicrobiana en los sobrenadantes de la cepa recombinante de *M. extorquens* S25 (pS25). No obstante, el empleo de columnas cromatográficas de adsorción hidrofóbica y de fase inversa permitió la recuperación de EntP funcionalmente activa de cultivos de *M. extorquens* S25 (pS25) con unos rendimientos de purificación superiores a los obtenidos de la purificación de la EntP producida por *E. faecium* P13 (Gutiérrez y col., 2005b).

Del mismo modo, las cepas de *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subesp. *lactis* DPC5598 y *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 transformadas con vectores que poseen el gen

estructural de la enterocina P (*entP*), con o sin su hipotético gen de inmunidad (*entiP*), han permitido la producción y expresión funcional de la EntP de los sobrenadantes de los cultivos productores utilizando vectores con diferentes sistemas de expresión: constitutivo (pMG36c), inducible (pNZ8048e) y de integración en el cromosoma (pINT29). La producción heteróloga y expresión funcional de la EntP por las cepas recombinantes de *L. lactis* dependió del hospedador y vector de expresión utilizados, así como de la presencia del gen *entiP*. La mayor producción de EntP se obtuvo de las cepas de *L. lactis* IL1403 (pJP214) y *L. lactis* NZ9000 (pJR199), que produjeron más EntP y de mayor actividad antimicrobiana que la cepa de *E. faecium* P13. Las cepas de *L. lactis* DPC5598 también permitieron la co-producción simultánea de nisina A (NisA) y EntP. La evaluación de la EntP purificada de *E. faecium* P13 y de *L. lactis* IL1403 (pJG214), determinó que ambas poseen una masa molecular idéntica, lo que sugiere que la síntesis, procesamiento y secreción de la EntP se realiza apropiada y adecuadamente en *L. lactis* (Gutiérrez y col., 2006). Por ello, sería de gran interés científico y aplicado determinar si fusiones génicas del péptido señal de la EntP (y de otras bacteriocinas Sec-dependientes) y la parte madura de otras bacteriocinas procesadas, transportadas y secretadas por sistemas de transporte dedicados (DTS) permiten el procesamiento, transporte, secreción y expresión funcional de dichas bacteriocinas por otros hospedadores, especialmente por cepas de *L. lactis* subesp. *lactis* y de *L. lactis* subesp. *cremoris*, en las que este sistema parece funcionar bien.

De los resultados previamente descritos se deduce que es posible la producción heteróloga en *L. lactis*, microorganismo de interés en la industria alimentaria, de otras muchas bacteriocinas y péptidos de interés mediante la fusión génica de los nucleótidos que los codifican a los del péptido señal de la EntP. De hecho, experiencias realizadas por nuestro grupo investigador han demostrado la validez de dicha hipótesis, ya que la construcción de quimeras génicas del péptido señal de la EntP fusionado a la secuencia nucleotídica de la enterocina A de *E. faecium* PLBC21 (Martín y col., 2007a) y de la pediocina PA-1 de *P. acidilactici* PLBH9 (Martín y col., 2007b) han permitido la producción heteróloga y expresión funcional de dichas bacteriocinas y su co-expresión con la nisina A en células recombinantes de *L. lactis*.

II.4.1.3. Optimización de la producción heteróloga de péptidos y proteínas en las bacterias lácticas

Dentro de las BAL, la especie *L. lactis* es una excelente candidata para la producción heteróloga de péptidos y proteínas (Le Loir y col., 2005). No obstante, muchos péptidos y proteínas adquieren durante su síntesis modificaciones estructurales complejas, lo que interfiere o dificulta su secreción. En lactococos, los sistemas desarrollados de producción heteróloga de proteínas permiten seleccionar la localización de la molécula producida (citoplásmica, anclada a la superficie o secretada al medio exocelular) mediante la utilización de péptidos señal (SP) adecuados. Los péptidos de señal más utilizados en lactococos para dirigir la secreción de proteínas heterólogas son el de la proteína mayoritaria secretada de lactococos (Usp45) y el de la proteinasa asociada a la pared celular (PrtP), aunque el primero suele ser más eficaz que el segundo (Le Loir y col., 2005; Mierau y Kleerebezem, 2005). Por ello, para optimizar los rendimientos de producción de péptidos y proteínas de interés, conviene evaluar la eficacia de diversos péptidos señal. El intercambio de péptidos señal homólogos por heterólogos suele ser una buena opción, aunque los resultados suelen ser inciertos (Lindholm y col., 2004). Asimismo, la fusión de un prepéptido corto sintético (como el LEISSICDA) entre el péptido señal y la

secuencia aminoacídica madura de la proteína o péptido de interés, puede también favorecer su secreción.

También se han desarrollado vectores de expresión que permiten la producción heteróloga de péptidos y proteínas en lactococos. El control de la producción heteróloga de péptidos y proteínas por dichos vectores puede realizarse mediante promotores constitutivos (pMG36c) ó inducibles (pNZ8048), existiendo también vectores de expresión de integración en el cromosoma bacteriano (pINT29). Igualmente, el conocimiento de que la síntesis de la nisina en *L. lactis* se encuentra regulada por un inductor (nisina A) que activa la transcripción de los genes involucrados en su síntesis, procesamiento, transporte y secreción, ha permitido el desarrollo de sistemas de expresión controlados por la nisina A (sistema NICE, del inglés “Nisin Controlled Expression”), que han demostrado su utilidad en la producción y expresión funcional de diversas proteínas y péptidos en muchas bacterias lácticas (Sybesma y col., 2003; Mierau y Kleerebezem, 2005; Mierau y col., 2005; Hazebrouck y col., 2007).

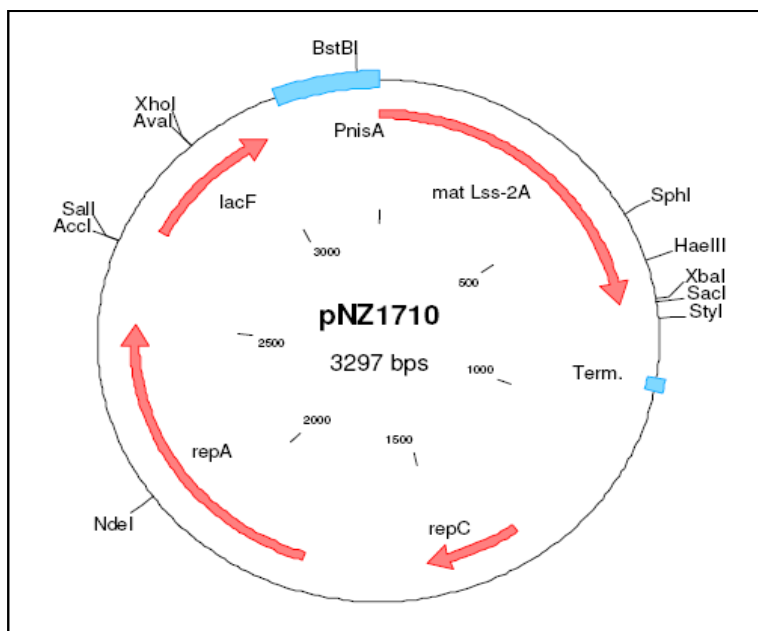


Figura 2.17. Plásmido pNZ1710, un ejemplo de vector de expresión controlado por la nisina A (sistema NICE). El gen que codifica la secuencia madura de la lisostafina (*matLss-2A*), péptido antimicrobiano producido por *Staphylococcus simulans* especialmente activo contra *Staphylococcus aureus*, se ha colocado bajo el control del promotor inducible de la nisina (P_{nisA}). Term., terminador de la transcripción; *repC* y *repA*, genes de replicación; *lacF*, marcador de selección de utilización de la lactosa. Fuente: Mierau y col. (2005).

En el sistema NICE la cepa más utilizada como hospedadora es la de *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000 (con los genes *nisK* y *nisR* integrados en *pepN*). La existencia de cepas con mutaciones en los genes *clp* (proteasa intracelular), *dnaK* (chaperona que promueve una proteólisis intracelular) y *htrA* (proteasa asociada a la pared celular) mejorarían la producción heteróloga de péptidos y su estabilidad (Miyoshi y col., 2002; Lindholm y col., 2004). Igualmente, de los diversos vectores disponibles, el pNZ8048 es el más utilizado para las fusiones traduccionales. El que cada día sea más fácil y asequible la construcción de genes sintéticos con

las modificaciones nucleotídicas deseables hace innecesaria la utilización de otros vectores que permiten fusiones genéticas más complejas.

El sistema NICE es operativo en bacterias lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, aunque las cepas hospedadoras deben optimizarse con relación a la localización de los genes *nisRK* en un mismo plásmido, en dos plásmidos ó integrados en el cromosoma bacteriano (Mierau y Kleerebezem, 2005). Otros sistemas inducibles con las características del sistema NICE se han desarrollado también para su empleo en *B. subtilis* (sistema SURE, del inglés *Subtilin Regulated Gene System*) (Kleerebezem y col., 2004), *Lb. sakei* (Axelsson y col., 2003; Sorvig y col., 2005), *Lb. plantarum* (Mathiesen y col., 2004; Sorvig y col., 2005) y *Enterococcus* spp. (Hickey y col., 2003a), aunque no siempre los sistemas inducibles son preferidos a los constitutivos o de integración en el cromosoma bacteriano. Aunque existe muy poca información acerca de la utilización del sistema NICE en procesos industriales, recientemente Mierau y col., (2005) han descrito protocolos exitosos de optimización de la producción de una proteína recombinante por el sistema NICE en fermentadores de 1, 100 y 3.000 litros de capacidad. La optimización de la producción no solamente contempló la sustitución del marcador plasmídico antibiótico por otro de grado alimentario, sino la optimización del medio de cultivo con sustitución de componentes de origen animal por otros de origen vegetal.

Muchas especies de lactobacilos como *Lb. sakei*, *Lb. plantarum* y *Lb. casei* son también de interés en la industria alimentaria por su empleo como cultivos iniciadores, protectores o probióticos y por su potencial como factorías celulares de producción de proteínas y péptidos de interés en la salud humana y seguridad alimentaria. Por ello, como se ha descrito previamente en otra sección de esta memoria, Axelsson y col., (1998) desarrollaron un sistema basado en la utilización conjunta de dos plásmidos para la producción heteróloga de bacteriocinas de la clase Ila en *Lb. sakei*. Sin embargo, recientemente Sorvig y col., (2005) han descrito el diseño de vectores de la familia pSIP (pSIP300's y pSIP400's) funcionales en *Lb. sakei* y *Lb. plantarum* para la producción y expresión, inducible por péptidos feromonas, de genes que codifican proteínas maduras fusionadas a los promotores inducibles P_{sap} (sakacina A) y P_{spp} (sakacina P). La construcción de otros vectores de expresión para la producción heteróloga de péptidos y proteínas en otras bacterias como *Lb. casei* (Monedero y col., 2004), así como en aquellas del género *Bifidobacterium* (Moon y col., 2005) de tanto interés en la industria alimentaria hace que, realmente, la producción heteróloga de péptidos y proteínas de interés sea posible en la mayoría de las BAL.

II.4.2. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS EN LEVADURAS

Las levaduras combinan la facilidad de su manipulación genética y las características de crecimiento de las procariotas con los mecanismos de modificación postraducciona de las eucariotas. Por ello, levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* y las levaduras metilotróficas *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia methanolica* y *Pichia pastoris* (Cereghino y Cregg, 2000; Gellissen, 2000; Schuster y col., 2000; Cereghino y col., 2002; Daly y Hearn, 2005; Macaulay-Patrick y col., 2005), se han utilizado como hospedadores para la producción heteróloga de péptidos y proteínas de procariotas y eucariotas debido a sus elevados niveles de expresión génica y a que,

en muchos casos, poseen promotores potentes y fuertemente regulados. Igualmente, las levaduras constituyen una alternativa interesante frente a las BAL como hospedadores para la producción y expresión funcional de bacteriocinas ya que algunas, como *S. cerevisiae*, se utilizan en la industria alimentaria en la elaboración de alimentos como la cerveza, vino, sidra y otras bebidas alcohólicas y productos de panadería.

En *S. cerevisiae* se han descrito numerosos promotores inducibles para la expresión de los genes clonados (Schoeman y col., 1999; Schuster y col., 2000). Igualmente, el que *S. cerevisiae* se considere como microorganismo seguro favorece su elección como hospedador para la producción heteróloga de proteínas y péptidos de interés. Para la utilización de *S. cerevisiae* como hospedador heterólogo para la producción de proteínas y otros péptidos de interés, un trabajo previo de nuestro grupo investigador ha permitido la construcción de un vector de expresión y secreción para *S. cerevisiae*. El vector resultante, denominado pYES-2 α (Basanta y col., 2007) posee la capacidad de mantenerse como un episoma de elevado número de copias y permite la expresión de los genes clonados bajo el control del promotor del operon Gal1, inducible por galactosa y represible por glucosa. En este vector, la secreción de los péptidos o proteínas clonados se consigue tras la fusión de la secuencia nucleotídica de su forma madura al péptido señal del factor α de *S. cerevisiae* que incluye la región Kozak de inicio de la traducción y una región de clonación múltiple. La inducción del promotor Gal1 y la secreción de las proteínas y péptidos clonados se consigue mediante el desarrollo de las cepas de *S. cerevisiae* recombinantes en un medio de cultivo con galactosa y rafinosa.

De entre las levaduras metilotróficas, *Pichia pastoris* es la más utilizada como modelo para el desarrollo de sistemas de producción heteróloga de péptidos y proteínas. Esta levadura se considera de interés por su facilidad de manipulación genética, de transformación, de clonación, de producir elevados niveles de proteínas intracelulares y extracelulares y por su capacidad de realizar modificaciones típicamente eucariotas de los péptidos y proteínas producidas como la formación de enlaces disulfuro, glucosilación y procesamiento proteolítico. Además, la utilización de vectores de expresión de integración en el genoma facilita la estabilidad de los insertos en procesos de fermentación continuos y escalados. La utilización de *P. pastoris* como hospedador permite obtener buenos resultados de producción de proteínas recombinantes y el posible escalado de los ensayos de laboratorio a situaciones de tipo industrial. Además, la actividad biológica de los productos recombinantes secretados se facilita por los bajos niveles de producción de proteinasas nativas (Cereghino y col., 2002; Daly y Hearn, 2005; Macauley-Patrick y col., 2005).

Por lo que respecta a la producción heteróloga de bacteriocinas en levaduras, Schoeman y col., (1999) fueron los primeros en describir la producción heteróloga de la pediocina PA-1 en *S. cerevisiae*. Para ello, dichos investigadores utilizaron un vector de expresión con la pediocina PA-1 madura fusionada al péptido señal del factor α , una feromona de la levadura que se sintetiza como una preproteína y bajo el control del promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa. La transformación de *S. cerevisiae* con el plásmido recombinante se tradujo en la producción de PedA-1 biológicamente activa. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de la pediocina PA-1 de los sobrenadantes de los cultivos de las levaduras recombinantes fue muy pequeña, lo que se atribuyó a que la bacteriocina producida se mantenía asociada a la membrana ó a la pared celular de las células productoras. No obstante, la ausencia de técnicas

analíticas fiables de detección y cuantificación de la pediocina PA-1 producida no permitió determinar la relación entre la bacteriocina producida y su actividad biológica, probablemente, disminuida por una posible glucosilación de su molécula, por la actividad de enzimas proteolíticos, por agregación entre sí o a otras moléculas ó por otras razones bioquímicas o biofísicas aún no determinadas.

Recientemente, van Reenen y col., (2002) han descrito la clonación y producción de la plantaricina 423 de *Lb. plantarum* 423 en *S. cerevisiae*, describiendo las mismas limitaciones respecto a la actividad antimicrobiana de la plantaricina 423 de los sobrenadantes de las cepas recombinantes que las encontradas por Schoeman y col., (1999) respecto a la producción y actividad antimicrobiana de la pediocina PA-1. La clonación de la secuencia nucleotídica madura de la pediocina PA-1 en un vector de expresión y su producción en la levadura metilotrófica *P. pastoris* (Beaulieu y col., 2005), ha permitido la detección y cuantificación inmunoquímica (utilizando anticuerpos policlonales anti-pediocina PA-1 cedidos a dicho grupo por nuestro equipo investigador) de dicha bacteriocina en los sobrenadantes de los cultivos de *P. pastoris* recombinantes. Sin embargo, la pediocina PA-1 producida no mostró actividad antimicrobiana debido a una intensa asociación de ésta, probablemente mediante enlaces covalentes, con un material similar al colágeno.

Sin embargo, experiencias realizadas por nuestro grupo investigador han permitido describir por primera vez en la literatura científica internacional la producción y expresión funcional de una bacteriocina, la enterocina P (EntP), producida por *E. faecium* P13, en células recombinantes de *P. pastoris*. Efectivamente, cuando la secuencia nucleotídica que codifica la EntP madura se clonó en el vector de expresión pPICZ α A se obtuvo un plásmido recombinante que, cuando se linearizó e introdujo en el genoma de *P. pastoris* X33, originó un derivado recombinante, denominado *P. pastoris* X33t₁, que permitió la expresión funcional de la enterocina P con una mayor producción y actividad antimicrobiana que la obtenida de *E. faecium* P13 (Gutiérrez y col., 2005c).

II.5. EL ÁNADE REAL (*Anas platyrhynchos*)

II.5.1. BIOLOGÍA DEL ÁNADE REAL

El ánade real o ánade azulón (*Anas platyrhynchos*, familia Anátidos, orden Anseriformes) es el más conocido y popular de todos los patos, así como una de las especies más adaptables y extendidas de pato salvaje de la que descienden la mayoría de patos domésticos. La popularidad en España del ánade real o azulón se traduce en los numerosos nombres que recibe en todas las regiones: en Asturias se le conoce como *curro*, *corio*, *parro* y *curriu*; en Extremadura, *pato real*; en Castilla y León, *azulón* y *lavanco*; en Valencia, *collverd*; los marinos cantábricos y gallegos le denominan *pato marino*, etc. Pato nadador de gran tamaño respecto a otras especies, mide entre 45 y 60 cm y pesa de 700 a 1.600 g. La especie se encuentra muy extendida por el hemisferio norte, Norteamérica y Eurasia, pudiendo llegar en invierno hasta México, el norte de África y el sureste asiático. Aunque es capaz de criar en cualquier zona geográfica siempre que tenga a su disposición un poco de agua, lo hace en mayor proporción cuanto más se acerca al círculo polar, que constituye su frontera septentrional. Una gran proporción de ánades reales emigra a fines del invierno hacia el norte para anidar, pero muchos

otros permanecen en el centro y sur de Europa, en Marruecos, Turquía e Irán, Estados Unidos y México, e incluso existe una población sedentaria en Hawai.

El ánade real muestra un dimorfismo sexual muy acusado (Fig. 2.18). El macho es un ave inconfundible por su vistosidad. La cabeza y el cuello son de color verde oscuro brillante, cortado este último por un fino collar o anillo blanco. El dorso es marrón y el pecho castaño rojizo o marrón oscuro. La cola es llamativa, con las plumas rectrices blancas, cubiertas en su parte central por plumas negras y más arriba con otras rizadas de color verde negruzco. En las alas de color tostado, destaca mucho el espejuelo (mancha brillante y distintiva en las plumas secundarias superiores) de color morado o azul-violáceo, bordeado de negro y blanco. La parte inferior es gris teñida de marrón o parduzco. Las plumas debajo de la cola son negras. El pico es amarillo con ligero tinte verdoso, variable con frecuencia y la uña del extremo negra. Las patas y los pies son naranja rojizos. La hembra presenta un plumaje de color pardo, moteado y rayado, dándole aspecto de escamas. Los tonos son, por lo general, más apagados que en las hembras de otros patos. El pico suele ser de un color amarillo-anaranjado, más apagado que el del macho. A pesar de su plumaje común y poco llamativo, también presenta el espejuelo de color azul violáceo, ribeteado de blanco y negro, el cual, junto con su gran tamaño respecto a otras especies de patos, resulta un detalle inconfundible para su identificación. En plumaje de eclipse, que es completo de julio a agosto, los machos son muy parecidos a las hembras, pero tienen la cabeza y el cuello pardo oscuro, más que las hembras, y su tono es uniforme, siendo también el pecho más oscuro. Los ánades reales jóvenes se parecen a la hembra adulta, pero tienen las patas de color apagado y las membranas interdigitales más oscuras.



Fig.2.18. Macho y hembra de *Anas platyrhynchos*. Se aprecia claramente el marcado dimorfismo sexual. (A) y (C) pareja de ánades reales; (B) hembra de ánade real; (D) macho de ánade real. En estas dos últimas imágenes se observa el espejuelo morado o azul-violáceo en el ala de ambos ejemplares.

El ánade real muestra un vuelo característico: bate rápido las alas aunque no profundamente, y produce a su paso un sonido silbante característico. Camina bien por el suelo, bajando el cuello a nivel del cuerpo, y en el medio acuático se desenvuelve a la perfección, remando con las patas palmeadas o bien sumergiendo la parte delantera del cuerpo en busca de vegetación e invertebrados. Es un ave sociable que se reúne en bandadas de tamaño medio-grande en invierno, alcanzando en ocasiones el centenar de individuos, y tiende a separarse en parejas con la llegada de la primavera, época de cría. En ocasiones se empareja pronto, durante el invierno. También se le puede ver en bandos de otros patos, especialmente en compañía del silbón europeo (*Anas penelope*).

Como otras especies de ánades, el ánade real vive en lagunas con vegetación acuática, riberas, marismas, colas de embalses, márgenes de ríos, carrizales, aguazales, juncuales, canales y acequias. Sorprendentemente, se le puede encontrar en lugares áridos lejos del agua, y es frecuente su presencia en entornos humanizados como estanques y lagos de parques y jardines urbanos. El ánade real tiene una dieta omnívora, aunque su alimentación esté compuesta fundamentalmente por materia vegetal que incluye semillas, brotes y hojas de gran variedad de plantas acuáticas y terrestres. También es importante en su dieta la *zostera* marina (planta marina presente en estuarios, bahías o desembocaduras de los ríos) y numerosos frutos y bayas. Igualmente ingiere una gran diversidad de insectos y larvas, sobre todo de los géneros *Hemiptera* (chinchas, pulgones, etc.), *Coleóptera* (escarabajos), y *Diptera* (moscas, tábanos, mosquitos, etc.). Completa su dieta con la ingestión de moluscos (bígamos, caracoles, berberechos, tellinas, etc.), así como crustáceos, gusanos, lombrices de tierra, ranas, renacuajos, etc., presentes en aguas someras de estuarios, marismas y charcas, y en tierra firme, campos, sembrados y tierras cultivadas.

El ciclo diario de este ánade incluye una zona de reposo o sesteo y otra de alimentación que pueden encontrarse muy distantes entre sí. Para el reposo busca masas de agua, con frecuencia extensas para grupos o bandos, aunque también emplean masas de agua más pequeñas en las que las parejas vadean sueltas y aisladas. La alimentación, generalmente por la noche, suelen hacerlo en grupo. El período de la cría comienza pronto para esta especie, encontrándose los nidos ya contruidos en los últimos días de febrero, aunque más a menudo en marzo. Aunque no es muy exigente a la hora de buscar un lugar donde establecer los nidos, normalmente están situados en el suelo, entre vegetación acuática o arbustiva, carrizos, etc. Con frecuencia los construye en lugares insólitos como ventanas de casas abandonadas, en automóviles para desguace cercanos a masas de agua, huecos de árboles, agujeros en paredones, nidos viejos de córvidos, entre hiedra muy tupida, campos de cebada, etc. En zonas de densos carrizales, la nidificación pasa muy desapercibida por la escasa actividad desarrollada por los ánades durante el día. El nido suele ser una depresión en el suelo, tapizada de hojarasca, hierbas, ramitas y materia vegetal entremezclada con el plumón y las plumas que los propios patos añaden a medida que transcurre la incubación. Su aspecto es desaliñado y en el centro hay un somero cuenco en el que hace la hembra hace la puesta normal de 7 a 14 huevos. El período de puesta varía en la Península Ibérica, siendo a partir de marzo en la mitad sur, y desde abril y aún más tarde en la zona norte. Los huevos son de color blanco grisáceo o verdosos muy pálidos pero siempre con un matiz gris que les da aspecto poco limpio. Hasta que no completa la puesta, la hembra no comienza la incubación y, mientras tanto, cubre los huevos con plumón o hierbas permaneciendo el macho cerca del nido. La incubación dura entre 26 y 29 días.

Los pollos del mismo nido suelen nacer al mismo tiempo y, muy pronto, a las pocas horas, lo abandonan y se lanzan al agua en pos de la hembra donde nadan con gran soltura y persiguen a los pequeños dípteros que sobrevuelan o se posan en el agua. Al nacer, presentan una franja negra desde los ojos hasta la nuca y una mancha oscura muy visible en los oídos. El pico es muy oscuro en la mandíbula superior y más claro, de color blanco-rosado, en la inferior. Las patas son negruzcas con los laterales pálidos, casi blancos. A pesar de los enemigos que los pequeños ánades tienen en cualquier masa de agua, tales como aguiluchos laguneros, ratas, gaviotas, etc., los pollos se desarrollan muy bien y el índice de reproducción de la especie es alto. Durante su etapa de desarrollo, los machos progenitores sufren una temprana muda ("mancar" como se denomina habitualmente en el sur de España) que les incapacita para defender a su prole. Sin embargo, esta muda no es sufrida por las hembras progenitoras, sobre las que cae la responsabilidad de sacar adelante a la prole. A los 52-55 días los jóvenes ánades ya son capaces de volar perfectamente.

Como se ha comentado al inicio de este apartado, el ánade real ocupa en Europa una gran extensión, reproduciéndose desde el sur de Groenlandia, Islandia, Islas Feroes e Islas Británicas, hasta el noroeste de África, pasando por Eurasia hasta su extremo más oriental. Es una especie sedentaria en parte, aunque una población nada despreciable se desplaza desde sus lugares de cría, bien buscando un lugar común y ya tradicional para la muda, o en migración como se citará posteriormente, con movimientos nomádicos que son difíciles de interpretar y que están muy influenciados por los bruscos cambios de la meteorología invernal. Las poblaciones nativas de los países del norte de Europa son muy grandes y el conjunto de ellas, incluyendo la zona septentrional rusa, puede rebasar hoy los cinco millones de parejas reproductoras. Solamente en Dinamarca se calcula que la población nativa no es inferior a las 300.000 parejas. Mayor aún es en Holanda donde puede rebasar el medio millón. Todos los países que rodean el mar Báltico son tradicionalmente pateros y es muy importante la población de ánade real en el norte de Alemania, Polonia y demás países ribereños de aquel mar. Menores poblaciones hay en las Islas Británicas, Bélgica y Francia. En la Península Ibérica no existe un censo preciso de parejas reproductoras, repartiéndose por toda su extensión aunque con mayor densidad en la mitad meridional. Aunque el ánade real se haya distribuido con cierta uniformidad por ríos, lagunas, arroyos, charcas, marismas, rías, etc., alcanza una densidad mucho mayor en las conocidas zonas húmedas del sur y del levante español. Se distribuyen por la cuenca del río Ebro, desde Reinosa (Santander) hasta el propio Delta, donde es, con mucho, la anátida más abundante. Las lagunas, encharcamientos primaverales y colas de embalses distribuidas por la geografía peninsular, especialmente en la zona centro occidental, alberga una población de ánades reales notable. La Albufera de Valencia y las Marismas del Guadalquivir concentran ellas solas varios millares de parejas nidificantes, aunque también existe una población importante en la Laguna de Gallocanta (Zaragoza).

Al hablar de la migración y los movimientos de los ánades reales, conviene distinguir entre migración de muda, dispersión postgenerativa, fuga invernal, migración verdadera y "abmigración":

-Migración de muda: como sucede con otras anátidas, la migración de muda concentra a los ánades azulones en determinados lugares donde, al perder las plumas de vuelo de las alas, quedan como se les denomina en el sur de España "mancones", es decir, incapaces de volar por un período relativamente corto. No obstante, esta concentración no está

especializada en uno o pocos lugares, sino que los ánades azulones frecuentemente mudan en sus zonas de cría. En los últimos días de mayo ya se desprenden de algunas plumas, pero no es hasta el mes de julio cuando esta muda llega a su apogeo.

-Dispersión postgenerativa: afecta sólo a los jóvenes, que vuelan en todas direcciones sin preferencias acusadas por ningún lugar, desplazándose a lugares dispares aunque pertenezcan a la misma nidada. Esta dispersión puede durar hasta bien entrado el otoño.

-Fuga invernal: casi siempre están en íntima relación con situaciones meteorológicas desfavorables para los patos. Fríos intensos que hielan ríos y lagos e incluso aguas costeras, producen una desbandada hacia zonas más favorables al Sur. Condiciones de sequía excepcionales pueden también constituir un impulso de fuga de los ánades nativos de países mediterráneos.

-Migración verdadera: afecta sólo a una parte de las poblaciones de ánades, sobre todo a los que se reproducen en zonas del Norte y Nordeste del Continente, si bien estos movimientos habituales no hay duda que están forzados por el intenso frío de aquellos lugares.

-“Abmigración”: es un fenómeno peculiar de los ánades y con el que se trata de explicar la aparición de ejemplares lejos de sus comarcas natales durante la época de reproducción. Debido a que los ánades manifiestan tempranamente su celo a finales del invierno, ocurre a veces que en una comarca dada, individuos invernantes se emparejan con otros de diferente procedencia y al regresar los unos a sus países natales arrastran a los otros consigo. La consecuencia es que los ánades reales pueden aparecer en época de cría en un país, más o menos remoto, que no le corresponde a tenor de la costumbre innata de todos ellos de regresar a sus lugares de nacimiento.

Los ánades reales que invernán en la Península Ibérica pertenecen en su mayoría a la población nativa. Como sucede en época de cría, también en invierno se forman grandes concentraciones en zonas húmedas tradicionales y en la mayoría de las regiones en pequeños grupos o en parejas. Desde hace años, se están realizando en Europa censos de aves acuáticas invernantes, y en España la Sociedad Española de Ornitología ha cubierto costas y lugares interiores de querencias de anátidas, aunque el censo referido a toda España resulta difícil de completar por la gran dispersión de los ánades reales por la geografía peninsular, que afecta a los lugares y biotopos más dispares. Así y todo se ha alcanzado la cifra de más de 30.000 ejemplares. Aunque el mayor contingente se localiza en las Marismas del Guadalquivir, merece la pena resaltar por curioso lo que ocurre en la costa cantábrica. En dicha costa, el ánade real no es el pato más abundante en invierno. Sin embargo, un buen contingente de ánades reales dividido en grupos pequeños de 4-8 individuos forma, junto con el silbón europeo, un cordón marítimo a 10-20 millas de la costa que constituye un auténtico reposadero invernal en las aguas costeras cantábricas. Nada más oscurecer, los ánades levantan el vuelo y penetran tierra adentro para alimentarse en las praderas húmedas de la Cordillera Cantábrica y en embalses y lagunas con vegetación acuática. Al amanecer regresan al mar. Algo similar ocurre también en la Albufera de Valencia y toda la costa mediterránea, así como en las costas gallegas.

Los anillamientos efectuados por la Sociedad Española de Ornitología en la Estación Biológica de Doñana (ya que muchos se realizan en las Marismas del Guadalquivir) y las posteriores recuperaciones de los ejemplares anillados, ponen de manifiesto la anárquica

conducta de los ánades reales en sus vuelos de otoño e invierno. Así, se han dado casos de ejemplares anillados en Doñana y otras localizaciones del sur de la Península recuperados al cabo de uno o varios años en Polonia, Alemania, Letonia, Holanda, Francia, Marruecos, Portugal, Inglaterra, Bélgica, Gales, etc. También se ha dado el caso contrario, es decir, se han recuperado en España ánades reales anillados en otras localizaciones europeas como Francia, Holanda, Bélgica, Suecia, República Checa, etc., y existe una importante y nada despreciable población de ánades reales norte-europeos que escoge la Península Ibérica como lugar de invernación. Todo esto pone de manifiesto la anárquica conducta de sus vuelos migratorios.

II.5.2. ¿POR QUÉ EL ÁNADE REAL?

Considerando los aspectos relativos a la biología del ánade real y lo planteado en la exposición general del trabajo a investigar (capítulo I) parece que, *a priori*, la elección de esta especie de pato como punto de partida para la elaboración de este trabajo investigador es interesante. Debido a su *status* de pato salvaje no sometido a la manipulación o manejo por el hombre, con especial atención al empleo de antibióticos u otros agentes antimicrobianos que pudieran modificar, seleccionar e incluso homogeneizar su microbiota intestinal, así como a la alteración de sus hábitos alimenticios mediante el uso de piensos y suplementos, cabría esperar que su microbiota intestinal, incluyendo a los enterococos, fuera variada y compleja, con menor presencia de aislados resistentes a antibióticos o que incluso hospedase nuevas especies microbianas o especies poco frecuentes, difíciles de detectar o aislar en animales domésticos sometidos a la manipulación humana.

Por otro lado, el carácter cosmopolita y viajero del ánade real, debido a su amplia distribución, a su adaptabilidad, a las diferentes y complejas migraciones que realiza a lo largo de su vida, así como a la diversidad de ecosistemas en los que se encuentran, desde estanques o jardines urbanos, hasta marismas, desembocaduras, embalses o zonas costeras, hace que los microorganismos que puedan incorporarse a su microbiota sean de lo más variado y variable.

Otro aspecto que contribuye a la variedad de especies microbianas potencialmente presentes en su microbiota es su dieta. Como se ha descrito previamente, aunque en su dieta predomina el componente vegetal, el ánade real es omnívoro, pudiendo alimentarse, además de diferentes plantas y semillas tanto acuáticas (de agua dulce y salada) como terrestres, de moluscos, lombrices, renacuajos e insectos. Esta variedad de alimentos ingeridos hace que su microbiota pueda estar constituida por microorganismos de diversa procedencia, de diversos nichos y ambientes y de variados ecosistemas, cada uno con diferentes sistemas de adaptación y competencia por el sustrato y, por ello, potenciales productores de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) y otras sustancias antimicrobianas, ya descritas o aún por descubrir.

Además, su adaptabilidad hace que el ánade real sobreviva en aguas o ambientes acuáticos con una elevada carga microbiana e incluso con niveles de contaminación en las que otras especies no podrían sobrevivir. Por todo ello, podría decirse que el ánade real constituye un “laboratorio volante”, un interesante ecosistema para la evaluación de aspectos higiénicos (actividad antimicrobiana) y de seguridad (factores de virulencia) asociados a la presencia de enterococos en las canales y contenido intestinal de dichos animales.

Además, derivado de la actividad cinegética se abaten en España, cada año, miles de ejemplares de ánades reales en un periodo que abarca desde octubre a enero, aunque ligeramente variable según la Comunidad Autónoma en cuestión. Las condiciones sanitarias aplicables al sacrificio de animales de caza silvestre y a la producción y comercialización de sus carnes se establecen en el Real Decreto 2044/1994, de 14 de octubre (BOE, nº 298, 14-12-04). Sin embargo, la protección al consumidor derivada de la aplicación de este Real Decreto no se aplica con igual intensidad a la cesión al consumidor o al detallista, por parte del cazador, de piezas enteras de caza silvestre sin desollar ni desplumar y, cuando se trata de caza menor silvestre, sin eviscerar. Por ello, y para evaluar las condiciones higiénicas y de seguridad asociadas a la presencia de enterococos en animales de caza silvestre, sin desplumar, ni eviscerar, se ha considerado oportuno evaluar los aspectos higiénicos, de seguridad y el potencial biotecnológico de enterococos aislados de ánades reales (*Anas platyrhynchos*) procedentes de la actividad cinegética y destinados al consumo humano.

CAPÍTULO III
ASPECTOS HIGIÉNICOS,
SEGURIDAD Y POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO DE
ENTEROCOCOS
BACTERIOCINOGENICOS
AISLADOS DE ÁNADES REALES
(*Anas platyrhynchos*)

CHAPTER III
ANTIMICROBIAL AND SAFETY
ASPECTS AND
BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL
OF BACTERIOCINOGENIC
ENTEROCOCCI ISOLATED FROM
MALLARD DUCKS (*Anas platyrhynchos*)

Artículo publicado en el International Journal of food
Microbiology

Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*)

J. Sánchez, A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L.M. Cintas, P.E. Hernández *

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Received 13 April 2007; accepted 26 April 2007

Abstract

Samples from the intestinal content and carcasses of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) were evaluated for enterococci with antimicrobial activity, presence of genes coding bacteriocins and their expression, and potential virulence factors. *Enterococcus faecalis* comprised the largest enterococcal species with antagonistic activity followed by *E. faecium*, *E. hirae*, *Enterococcus* spp., and the non-enterococci. Although all *E. faecalis* isolates manifested a potent direct antimicrobial activity, no activity was detected in supernatants of most producer cultures. However, all *E. faecium* isolates showed antimicrobial activity in their supernatants and encoded bacteriocins, although the occurrence in the isolates of several enterocin genes did not always correlate with a higher antagonistic activity in supernatants. The *efaAfm* determinant was the only virulence gene detected in *E. faecium*, while *E. faecalis* showed a larger number of virulence determinants, and *E. hirae* did not carry any of the virulence genes examined. The rapid identification of genes coding described bacteriocins permits recognition of isolates that are potentially producers of novel bacteriocins. Purification of the antimicrobial activity of *E. hirae* DCH5 and *Lactococcus garvieae* DCC43 revealed unique chromatographic fragments after MALDI-TOF mass spectrometry analysis, suggesting the antagonistic peptides were purified to homogeneity. Bacteriocinogenic *E. faecium* and *E. hirae* isolates may be considered hygienic for production of bacteriocins, and potentially safe due to their low incidence of potential virulence genes and susceptibility to most clinically relevant antibiotics. However, the presence among the enterococci of *E. faecalis* strains with a potent antagonistic activity and multiple virulence factors, raises concerns regarding their potential pathogenicity to consumers. © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Enterococcus*; Enterococci; Enterocins; Virulence factors; Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*)

1. Introduction

The enterococci are lactic acid bacteria (LAB) that are important in environmental, food, and clinical microbiology. These bacteria play a beneficial role in the development of the sensory characteristics of fermented foods and have been successfully used as starter and adjunct cultures, and as probiotics. Detrimental aspects may, among others, include their consideration as indicators of faecal contamination, the spoilage of foods and the production of toxic amines (Franz et al., 2003; Foulquié-Moreno et al., 2005). Many enterococci also produce a diverse and heterogeneous group of ribosomally synthesized antimicrobial peptides or bacteriocins, generically referred to as enterocins

(Cintas et al., 2001; Foulquié-Moreno et al., 2005). Most bacteriocins from LAB are synthesized as inactive prepeptides containing an N-terminal extension. The mature peptides are often cationic, amphiphilic, membrane-permeabilizing molecules, divided into classes (Cotter et al., 2005; Fimland et al., 2005). Bacteriocins may inhibit pathogenic bacteria with a beneficial impact as protective cultures (Cotter et al., 2005).

However, the enterococci are now becoming recognized as important causes of nosocomial and to a lesser extent community-acquired infections. Typical enterococcal infections occur in hospitalized patients with underlying conditions representing a wide spectrum of severity of illness and immune modulation. Moreover, due to the higher incidence of infections by enterococci in young, older and immunocompromised patients, and to their extended resistance to antibiotics, they are being considered as emerging pathogens (Franz et al., 2001; Pillar and Gilmore,

* Corresponding author. Tel.: +34 913943752; fax: +34 913943743.

E-mail address: ehernan@vet.ucm.es (P.E. Hernández).

2004). The majority of infections are caused by either *E. faecalis* or *E. faecium* (Kayser, 2003; Nallapareddy et al., 2005). However, strains of *E. gallinarum* (Dargere et al., 2002), *E. hirae* (Poyart et al., 2002), and *E. mundtii* (Higashide et al., 2005) have been also implicated as responsible of endophthalmitis and native valve endocarditis in humans. Motile enterococci, such as *E. casseliflavus* are rare causes of enterococcal bacteremia (Pappas et al., 2004). An outbreak of *E. faecium*-related sepsis has been also documented to spread from pigs to humans (Lu et al., 2002).

Clinical isolates of enterococci involved in human infections and antibiotic resistance are also producers of bacteriocins or bacteriocin-like molecules (Shankar et al., 2002; Nallapareddy et al., 2005) and, in addition, many enterococcal isolates of different origin carry potential virulence factors (Eaton and Gasson, 2001; Franz et al., 2001; Semedo et al., 2003a; Martín et al., 2006). Mobile genetic elements coding virulence determinants can be transferred to food associated enterococci (Cocconcelli et al., 2003), and participate in molecular communication between bacteria of the animal and human microflora (Saavedra et al., 2003), giving the enterococci a new dimension regarding their potential pathogenicity for immunocompromised persons.

Therefore, the presence of enterococci in foods may have a beneficial effect for their role as antimicrobial agents but also a possible concern as microorganisms involved in nosocomial and opportunistic infections (Foulquié-Moreno et al., 2005; Martín et al., 2005; Yousif et al., 2005; Martín et al., 2006). The safety of foods containing enterococci is an issue that the food industry must carefully address (Franz et al., 2003; Foulquié-Moreno et al., 2005). Thus, of great interest would be to evaluate the hygienic (antimicrobial activity) and safety aspects (virulence factors) related to the presence of enterococci in the intestine and carcasses of wild animal species, profitable for human consumption and available from hunting (Martín et al., 2006). The mallard duck (*A. platyrhynchos*) is a common and widespread dabbling duck which breeds throughout the temperate and sub-tropical areas of North America, Europe and Asia. In Spain more than five million small game birds, including mallards, are shot down per year. In this study, enterococci isolated from mallard ducks have been evaluated for their antimicrobial activity, presence of genes encoding bacteriocins and their expression, and potential virulence factors.

2. Materials and methods

2.1. Microbiological analysis, indicator strains and bacteriocinogenic assays

Samples from the intestinal content and carcasses of mallard ducks (*A. platyrhynchos*) were evaluated for the microbiological selection of enterococci after cultivation on (i) Slanetz and Bartley medium (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 44 °C for 48 h, (ii) Kanamycin Aesculin Azide agar (KAA) medium with the kanamycin selective supplement (Oxoid) at 40 °C during 48 h, and (iii) Columbia agar base medium with the Staph/Strep selective supplement (Oxoid) in air supplemented with 5% CO₂ at 37 °C for 48 h. Indicator strains used for determination of the antimicrobial activity of selected isolates are shown in Table 1. The antimicrobial activity of isolates was screened by the stab-

on-agar test, while the antimicrobial activity of cell-free culture supernatants was screened by an agar diffusion test (ADT) and, when stated, by a microtiter plate assay (MPA) (Cintas et al., 2000; Martín et al., 2006). Supernatants were subjected to proteolytic treatment with α -chymotrypsin, trypsin and proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), at 1 mg/ml for 37 °C during 2 h, to ascertain the protein nature of their antagonistic activity. When stated *Pediococcus damnosus* CECT 4797 was used as the indicator microorganism.

2.2. Enterococcal genus and species identification

The assignment of antagonistic isolates to the genus *Enterococcus* and identification of the *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. flavescens*, and *E. casseliflavus* species was performed using genus- and species-specific PCR primers (Martín et al., 2006). *E. faecalis* V853, *E. faecium* BM4147, *E. gallinarum* BM4174, *E. casseliflavus* CECT 969^T, and *E. flavescens* CECT 970^T were used as the positive control strains. Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, UK). The identity of the *Enterococcus* sp. DCH5 isolate and the non-enterococcal DCC43 strain was evaluated by comparing their whole-cell protein profile, determined by analyzing their cell extracts by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), with protein profiles of previously described bacteria by Marc Vancanneyt, University of Ghent (BCCM/LMG Culture Collection, Ghent, Belgium).

2.3. PCR-detection of enterocin structural genes and potential virulence factors

PCR amplification of known structural genes of enterocin A (*entA*), enterocin B (*entB*), enterocin P (*entP*), enterocin L50 (*entL50A-entL50B*), enterocin Q (*entqA*), mundticin KS (*munKS*), enterocin AS-48 (*as-48*), bacteriocin 31 (*bac31*), enterocin 1071A and 1071B (*ent1071A-ent1071B*), enterolysin A (*enlA*), and the cytolysin (hemolysin-bacteriocin) precursor (*cylL_L-cylL_S*), was performed with specific bacteriocin PCR primers (Martín et al., 2006). Some of the indicator strains listed in Table 1 have been also used as positive controls for amplification of *entA*, *entB*, *entP*, *entL50A-entL50B*, *entqA*, and *as-48*. *E. faecalis* F2 was used as a positive control for detection of *cylL_L-cylL_S*. No positive controls were available for detection of genes *bac31*, *munKS*, *ent1071A-ent1071B*, and *enlA*. Primers EntA-F and EntA-R have been also used for amplification of a 380-bp fragment of genes *entA-entiA* of *E. faecium* T136, while primers EntP-F and EntP-R have been used for amplification of a 423-bp fragment of genes *entP-orf2* of *E. faecium* P13 (Martín et al., 2006). Primers GL50B-F (5'-AAAACATATAGTCAGTC TCAATCACTG-3') and EntL50-R2 (Martín et al., 2006) have been used for amplification of a 1860-bp fragment of genes *orfG-entL50B* of *E. faecium* L50, while primers EL50B-F (5'-ATAACGCCCCCTTATGCTTT-3') and EntL50-R2 (Martín et al., 2006) amplify a 1053-bp fragment of genes *orfE-entL50B*. Primers EntL50-R1 (Martín et al., 2006) and L50AD-R (5'-GAAAGGCCTACGGCTCAAG-3') amplify a 1502-bp fragment of genes *entL50A-orfC*, and primers EntL50-R1 and

L50AC-R (5'-CTAACGGCTTCAGCATTTGA-3') amplify a 1832-bp fragment of genes *entL50A-orfD*. The primer pairs L50J40-F (5'-AAAAATGATTGGAGGAGTTATATTATG-3') and L50J40-R (5'-CGAATGTTTACACAACAAAAAAC-3'), and the primer pairs L50J45-F and L50J45-R have been used, respectively, for amplification of a 400-bp and 450-bp fragments covering partly the upstream and downstream nucleotide sequence of genes *entL50A-entL50B* of *E. faecium* L50 (Cintas et al., 1998). Primers used for amplification of genes *agg* (aggregation substance), *gelE* (coding for gelatinase), *cylL_L-cylL_S* (cytolysin precursor), *cylM* (posttranslational modification of cytolysin), *cylB* (transport of cytolysin), *cylA* (activation of cytolysin), *esp* (enterococcal surface protein), *efaAfm* and *efaAfs* (cell wall adhesins of *E. faecium* and *E. faecalis*, respectively), and *cpd*, *cob*, and *ccf* (sex pheromones) were those described by Eaton and Gasson (2001) and Martín et al., (2006). The primer pairs RHCT1 and RHCT2 (Hickey et al., 2003) have been also used for amplification of the *cylL_LL_SM* cytolysin fragment. *E. faecalis* P4 has been used as a positive control for amplification of gene *agg*, *E. faecalis* OG1s for gene *gelE*, *E. faecalis* P36 for gene *esp*, *E. faecalis* EBH1 for gene *efaAfs*, *E. faecium* F10 for gene *efaAfm*, and *E. faecalis* F2 for genes *cpd*, *cob* and *ccf*.

2.4. PCR analysis, DNA sequencing and other DNA manipulations

PCR-amplifications were performed from total bacterial DNA obtained using the Wizard® DNA Purification Kit (Promega,

Madrid, Spain) in 50 µl reaction mixtures with 1–3 µl of purified DNA, 70 pmol of each primer and 1 U of Platinum® *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Madrid, Spain). Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (97 °C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94 °C for 45 s), annealing (41 to 67 °C for 30 s) and elongation (72 °C for 30 s to 2 min), ending with a final extension step at 72 °C for 7 min in a DNA thermal cycler Techgene (Techne, Cambridge, UK). PCR resulting fragments were analyzed by electrophoresis in 2% agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels, with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad, Madrid, Spain). When required, PCR-generated fragments were purified by a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) or by agarose gel electrophoresis followed by extraction with a QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Determination of the nucleotide sequence of the PCR-purified fragments was performed using the ABI PRISM® BigDye™ Terminator cycle sequencing kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the DNA sequencing service Sistemas Genómicos (Valencia, Spain).

2.5. Production of gelatinase and hemolysin, and antibiotic susceptibility testing

Production of gelatinase and investigation of hemolysis were performed as described (Martín et al., 2006). Antimicrobial susceptibility patterns were determined by soft agar overlay

Table 1
Antimicrobial activity of representative isolates and classification into different inhibitory groups^a

Isolate	Group of inhibition	Indicator microorganisms ^b													
		<i>L. monocytogenes</i>				<i>Lb. sakei</i>	<i>E. faecium</i>			<i>L. lactis</i>	<i>E. faecalis</i>			<i>P. acidilactici</i>	<i>P. pentosaceus</i>
		935	5105	4032	ScottA	2714	L50	P13	T136	BB24	INIA4	P4	F2	347	FBB61
DCH2	I	9.3	12.8	6.0	9.0	9.8	7.7	8.2	–	–	–	7.5	5.3	–	5.5
DEC7	II	14.6	13.9	14.1	12.4	12.9	11.1	11.7	6.8	11.0	9.2	9.9	7.7	4.6	7.8
DCH3	III	5.2	12.7	5.8	3.3	8.5	–	10.3	9.7	–	10.4	6.9	5.1	9.9	9.7
DAC9	IV	–	6.1	7.8	6.5	12.5	5.4	7.8	7.6	6.0	6.5	–	4.3	7.6	8.0
DAC2	V	4.6	10.7	13.9	9.3	9.6	9.7	9.9	8.2	–	6.5	5.6	6.6	–	7.8
DAC7	VI	–	7.8	10.2	–	10.1	6.8	7.8	9.9	–	7.0	6.3	5.1	–	3.4
DAC10	VII	–	–	–	–	7.2	–	5.5	–	–	–	6.5	5.6	5.7	–
DAC37	VIII	–	–	6.5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
DCC17	IX	–	5.7	–	–	7.1	7.4	6.9	6.7	5.1	9.8	–	–	8.0	11.6
DBH9	X	–	–	–	–	11.0	6.3	7.5	7.4	6.4	6.8	–	–	6.8	9.1
DBC4	XI	–	7.6	–	7.9	9.6	5.9	6.2	7.7	4.4	–	–	–	5.9	9.5
DBC9	XII	–	7.1	–	6.2	9.9	6.1	6.8	6.6	5.7	4.9	–	–	6.4	8.2
DBC16	XIII	–	–	–	–	8.7	–	5.2	–	–	–	–	–	5.4	–
DCH5	XIV	–	10.0	–	–	5.1	5.8	7.6	9.1	–	6.3	5.8	6.4	–	–
DCH37	XV	4.2	6.7	5.9	6.4	–	–	6.2	10.2	–	10.1	5.2	4.8	8.7	8.6
DCC14	XVI	–	7.1	–	–	8.9	8.5	8.4	8.7	–	6.0	–	–	–	–
DCC32	XVII	–	–	–	–	7.9	6.0	7.9	6.7	5.0	–	–	–	5.6	10.6
DCC43	XVIII	–	5.7	–	5.4	4.0	–	5.6	–	6.9	–	–	–	4.6	–
DDC28	XIX	–	12.8	8.8	12.4	11.4	11.1	12.0	–	8.7	9.4	10.6	8.6	–	7.9
DEC23	XX	6.1	5.4	6.0	6.6	6.7	5.0	–	5.4	–	5.2	–	–	6.4	6.6

^a Antimicrobial activity as determined by the stab-on-agar test. Results as the diameter of the halos of inhibition in millimeters (mm). (–) antimicrobial activity not detectable.

^b *L. monocytogenes* 935, 5105 and 4032 were obtained from the CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain), and *L. monocytogenes* ScottA was obtained from the DNBTA (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain). *Lb. sakei* 2714 was obtained from the NCFB (National Collection of Food Bacteria, Reading, UK). *E. faecalis* INIA4 was obtained from the INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, Spain). *E. faecalis* P4 and F2 were obtained from the IFR (Institute of Food Research, Norwich, UK) and *P. pentosaceus* from the TNO (Nutrition and Food Research, Zeist, The Netherlands). *Lactococcus lactis* BB24 (producer of nisin A), *E. faecium* T136 (producer of EntA and EntB), *E. faecium* P13 (producer of EntP), *E. faecium* L50 (producer of EntP, EntL50A, EntL50B, and EntQ), and *P. acidilactici* 347 (producer of PedA-1), were from our own LAB collection.

disc diffusion on Diagnostic Sensitivity Test (Oxoid) agar plates. Antibiotic-containing disks (Oxoid) were those of ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), clindamycin (2 µg), erythromycin (15 µg), fusidic acid (10 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), norfloxacin (10 µg), penicillin G (10 IU), rifampicin (5 µg), streptomycin (10 µg), tetracycline (30 µg), and vancomycin (30 µg). Inhibition zone diameters were measured after overnight incubation of the plates at 37 °C. Resistance phenotypes were recorded as recommended (NCCLS, 2002).

2.6. NCI-ELISAs, purification of enterocins and mass spectrometry analysis

Polyclonal antibodies with predetermined specificity for enterocin P (Gutiérrez et al., 2004), enterocin L50 (EntL50, EntL50A and EntL50B) and enterocin Q (Criado et al., 2006), and enterocin A (Martínez et al., 2000) were used. The presence of bacteriocins in the supernatants of isolates of interest was detected and quantified using a non-competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA), as described (Martín et al., 2006). The antimicrobial activity of selected isolates was also purified as described (Cintas et al., 2000; Gutiérrez et al., 2004; Martín et al., 2006). Briefly, supernatants from early stationary phase 1-liter cultures grown in MRS broth at 32 °C were subjected to precipitation with

ammonium sulfate, applied to gel filtration PD-10 columns and further subjected to cation-exchange (SP Sepharose Fast Flow) and hydrophobic-interaction (Octyl Sepharose CL-4B) chromatographies, followed by reverse-phase chromatography in a C₂ to C₁₈ column (PepRPC HR 5/5) integrated in a FPLC system (RP-FPLC). Fractions with high bacteriocin activity were mixed and rechromatographed on the reverse-phase column to obtain chromatographically pure bacteriocin. During purification, bacteriocin activity was calculated by an MPA. Purified fractions from the last RP-FPLC step were subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Gutiérrez et al., 2006; Martín et al., 2006). All chromatographic columns and supporting gels were from Amersham Biosciences Europe GmbH (Cerdanyola, Spain).

3. Results

3.1. Identification of isolates with antimicrobial activity

Samples from the intestinal content and carcasses of mallard ducks were evaluated for antagonistic isolates with direct antimicrobial activity against selected indicator bacteria, and their antimicrobial spectra permitted their classification in 20 inhibition spectrum groups (I to XX) (Table 1). From the antagonistic isolates, 31 (2 isolates of group I, 6 isolates of group

Table 2
PCR-amplification of bacteriocin structural genes from isolates of the intestinal content and carcasses of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*)

Isolate	Group of inhibition	Supernatant activity	Species ^a	entP	entL50A-entL50B	entqA	entA	entB	entL
DCH2	I	+	<i>Fcium</i>	+	+	–	+	+	–
DCH39	I	+	<i>Fcium</i>	–	–	–	+	+	–
DEC7	II	+	<i>Fcium</i>	–	–	–	+	+	–
DEC8	II	+	<i>Fcium</i>	–	–	–	+	+	–
DBH18	II	+	<i>Fcalis</i>	–	+	–	–	–	–
DBH20	II	+	<i>Fcalis</i>	–	+	–	–	–	–
DBC5	II	–	<i>Fcalis</i>	–	–	–	–	–	–
DCH9	II	–	<i>Fcalis</i>	–	–	–	–	–	–
DCH3	III	+	<i>Fcium</i>	+	+	+	–	–	–
DCH1	III	+	<i>Fcium</i>	+	+	+	–	–	–
DAC9	IV	–	<i>Fcalis</i>	–	–	–	–	–	+
DAC8	IV	–	<i>Fcalis</i>	–	–	–	–	–	+
DAC2	V	+	<i>Fcium</i>	+	–	–	+	+	–
DAC7	VI	+	<i>Fcium</i>	+	–	–	–	–	–
DAC10	VII	–	<i>Fcalis</i>	–	–	–	–	–	–
DAC37	VIII	+	<i>Enter</i>	–	–	–	–	–	–
DAC41	IX	–	<i>Fcalis</i>	–	–	–	–	–	+
DCC17	IX	–	<i>Fcalis</i>	–	–	–	–	–	–
DBH9	X	–	<i>Fcalis</i>	–	–	–	–	–	+
DBC4	XI	–	<i>Fcalis</i>	–	–	–	–	–	+
DBC9	XII	–	<i>Fcalis</i>	–	–	–	–	–	+
DBC16	XIII	–	<i>Fcalis</i>	–	–	–	–	–	–
DCH6	XIV	+	<i>Hirae</i>	–	–	–	–	–	–
DCH5	XIV	+	<i>Hirae</i>	–	–	–	–	–	–
DCH37	XV	+	<i>Fcium</i>	+	+	+	–	–	–
DCH38	XV	+	<i>Fcium</i>	+	+	–	–	–	–
DCC14	XVI	+	<i>Fcium</i>	+	+	–	+	–	–
DCC32	XVII	–	<i>Fcalis</i>	–	–	–	–	–	–
DCC43	XVIII	+	<i>Garvieae</i>	–	–	–	–	–	–
DDC28	XIX	+	<i>Fcium</i>	–	–	–	+	+	–
DEC23	XX	–	<i>Fcalis</i>	–	–	–	–	–	+

^a *Fcium* is *E. faecium*; *Fcalis* is *E. faecalis*; *Enter* is *Enterococcus* sp., *Hirae* is *E. hirae*, and *Garvieae* is *L. garvieae*.

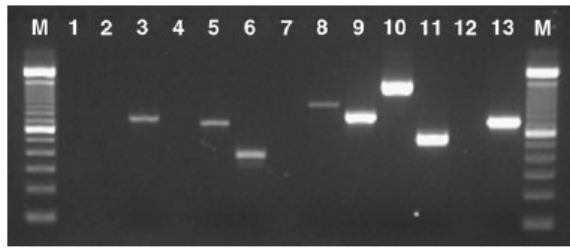


Fig. 1. PCR products from purified DNA from *E. faecalis* DBC4 amplified with primers for known virulence factors: lane 1, *cylL_L-cylL_S* (324-bp); lane 2, *cylL_LL_SM* (2659-bp); lane 3, *cylM* (742-bp); lane 4, *cylB* (843-bp); lane 5, *cylA* (701-bp); lane 6, *gelE* (419-bp); lane 7, *agg* (1553-bp); lane 8, *esp* (933-bp); lane 9, *cpd* (782-bp); lane 10, *cob* (1405-bp); lane 11, *ccf* (543-bp); lane 12, *EfaAfm* (735-bp); and lane 13, *EfaAfs* (705-bp).

II, 2 isolates of groups III, IV, IX, XIV, XV, and 1 isolate each from the rest of the antagonistic groups), were further identified. It was determined (Table 2) that all but one isolate (DCC43, group XVIII) amplified a 112-bp fragment for assignment to the genus *Enterococcus*. Those isolates that permitted further amplification of a 550-bp fragment were assigned to the species *E. faecium*, while those who amplified a 941-bp fragment were assigned to the species *E. faecalis*. However, enterococci from groups VIII and XIV could not be assigned to any of the enterococcal species evaluated. By SDS-PAGE comparison of whole-cell protein profiles, the unrecognized *Enterococcus* sp. DCH5 and *Enterococcus* sp. DCH6 isolates were identified as *E. hirae*, while the unidentified DCC43 isolate was identified as *Lactococcus garvieae* (results not shown).

3.2. Detection of enterocin structural genes and potential virulence factors

Purified DNA of selected enterococci was subjected to PCR-amplification to determine the existence of structural genes

coding described enterocins. All *E. faecium* isolates amplified either a 216-bp fragment of gene *entP*, a 172-bp fragment of *entA*, a 126-bp fragment of *entB*, a 286-bp fragment of enterocin L50 (*entL50A-entL50B*) or a 105-bp fragment of *entqA* (Table 2). However, only the *E. faecalis* isolates DBH18 and DBH20 showed detectable antimicrobial activity in their supernatants with amplification of the 286-bp fragment coding enterocin L50. The rest of the *E. faecalis* isolates did not manifest antimicrobial activity in their supernatants, although 54% of them amplified a 1770-bp fragment of gene *enlA*. None of the *E. faecium* or *E. faecalis* isolates, nor the *Enterococcus* sp. DAC37, the *E. hirae* isolates DCH5 and DCH6, and the *L. garvieae* DCC43 showed amplification fragments with the primers used. None of the evaluated strains showed PCR-amplification fragments for genes *cylL_L-cylL_S*, *as-48*, *munkS*, and *ent1071A-ent1071B*.

The presence in the selected isolates of genes coding potential virulence factors was also evaluated (results not shown). All *E. faecium* isolates amplified a 735-bp fragment coding *efaAfm*, while all *E. faecalis* isolates amplified the 705-bp fragment of *efaAfs*, the 419-bp fragment of the *gelE* determinant, and the 782-bp and 543-bp fragments of the sex pheromone genes *cpd* and *ccf*. All but three *E. faecalis* isolates also amplified the 1405-bp fragment of the sex pheromone gene *cob*. Only *E. faecalis* DCH9 and *E. faecalis* DAC10 amplified the 1553 fragment of the *agg* gene, while *E. faecalis* DBC4 was the only isolate to amplify the 933-bp fragment of the gene *esp*, the 742-bp fragment of the gene *cylM* and the 701-bp fragment of the gene *cylA* (Fig. 1). All *E. faecalis* isolates were phenotypically hemolysin (Hly) and gelatinase (GelE) positive. However, the *E. hirae* isolates DCH5 and DCH6 and *L. garvieae* DCC43 did not show any amplification fragment for potential virulence factors with the primers used. Phenotypes recorded from antimicrobial susceptibility patterns indicated that all *E. faecium* and *E. faecalis* isolates were resistant to nalidixic acid and

Table 3

Production of bacteriocins and antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* strains isolated from the intestinal content and carcasses of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*)

Isolate	Group of inhibition	Production of EntP (ng/ml) ^a	Production of EntL50A (ng/ml) ^a	Production of EntL50B (ng/ml) ^a	Production of EntQ (ng/ml) ^a	Production of EntA (ng/ml) ^a	Antimicrobial activity (BU/ml) ^b
DCH2	I	960	0	0	—	2020	12,918
DCH39	I	—	—	—	—	2070	12,768
DEC7	I	—	—	—	—	2297	22,183
DEC8	I	—	—	—	—	1772	16,526
DCH1	III	5366	23	28	705	—	2724
DCH3	III	5793	37	47	903	—	3709
DAC2	V	1642	—	—	—	2705	14,141
DAC7	VI	1071	—	—	—	—	446
DCH37	XV	4729	33	39	2120	—	3274
DCH38	XV	3235	65	72	—	—	10,743
DCC14	XVI	498	0	0	—	0	262
DDC28	XIX	—	—	—	—	2233	20,783
L50	NA	5488	55	58	1102	—	16,230
P13	NA	7800	—	—	—	—	7770
T136	NA	—	—	—	—	2450	12,428

(—) no presence of the structural gene.

NA: control strains, not ascribed to inhibition groups.

^a Detection and quantification by a NCI-ELISA.

^b Antimicrobial activity as determined by a microtiter plate assay (MPA), with *P. damnosus* CECT 4797 as indicator microorganism.

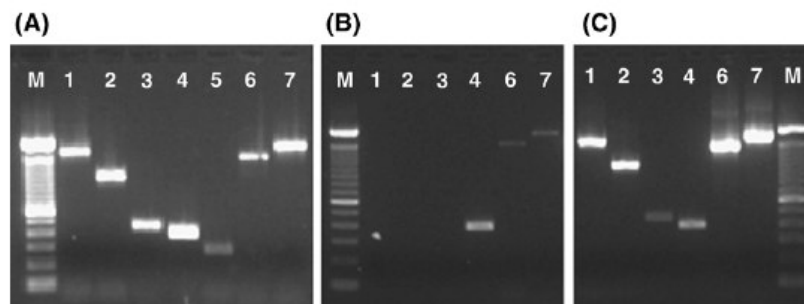


Fig. 2. PCR-amplification fragments of purified DNA from *E. faecium* L50 (A), *E. faecium* DCH2 (B), and *E. faecium* DCC14 (C), using the following primer pairs specific for the EntL50 operon and adjacent genes: lane 1, GL50B-F/EntL50-R2; lane 2, EL50B-F/EntL50-R2; lane 3, L50J45-F/L5045-F; lane 4, L50J40-F/L50J40-R; lane 5, EntL50-R1/EntL50-R2; lane 6, EntL50-R1/L50AD-R; and lane 7, EntL50-R1/L50AC-R. M, nucleic acid molecular size marker 100 bp DNA ladder.

streptomycin, while most of them were also resistant to kanamycin and clindamycin. Some *E. faecium* isolates were resistant to ciprofloxacin while many *E. faecalis* isolates were resistant to rifampicin and gentamicin. *E. faecium* DCH39 and *E. faecium* DEC28 showed resistance to erythromycin and tetracycline, and *E. faecium* DDC28 to tetracycline and chloramphenicol. All enterococci were sensitive to penicillin G, ampicillin, vancomycin, teicoplanin, chloramphenicol, fusidic acid, norfloxacin, and nitrofurantoin.

3.3. Evaluation of *E. faecium* isolates for production of bacteriocins

Representative *E. faecium* isolates carrying structural genes for production of known bacteriocins were evaluated for production and functional expression of their bacteriocins in supernatants of producer cells. The NCI-ELISA data (Table 3), determined that *E. faecium* DCH2 of the group of inhibition I was a low producer of EntP, with no production of either EntL50A and/or EntL50B, suggesting that the structural *entL50A-entL50B* genes are silent for production of enterocin L50 (EntL50). Similarly, *E. faecium* DCC14 of the group of inhibition XVI and carrying the same structural genes as *E. faecium* DCH2 was a much lower producer of EntP than *E. faecium* DCH2 with no production of either EntL50A, EntL50B, and EntA, and with an antimicrobial activity that is only 1.7 to 2.2% of that of the control strains *E. faecium* L50 and *E. faecium* T136. Production of EntA by *E. faecium* DCH39 (group of inhibition I), *E. faecium* DEC7 and *E. faecium* DEC8 (group of

inhibition II), and *E. faecium* DDC28 (group of inhibition XIX) was 72 to 94% of that of the control *E. faecium* T136, although the antimicrobial activity of the isolates DEC7, DEC8, and DDC28 was 25 to 45% higher than that of *E. faecium* T136.

The NCI-ELISA data also confirmed the production of EntP and EntA by *E. faecium* DAC2 (group of inhibition V), while *E. faecium* DAC7 (group of inhibition VI) produced 14% of the EntP and 6% of the antimicrobial activity of the control strain *E. faecium* P13. When production of EntP, EntL50, and EntQ was quantified in *E. faecium* DCH1 and *E. faecium* DCH3 (group of inhibition III), and *E. faecium* DCH37 (group of inhibition XV), the production of EntP by all isolates was similar to that of *E. faecium* L50 while the production of EntL50 was 44 to 67% for production of EntL50A and 81% for production of EntL50B with larger fluctuations for production of EntQ as compared to that of *E. faecium* L50, whereas the antimicrobial activity of the supernatants was of 17 to 22% of that of *E. faecium* L50. However, *E. faecium* DCH38 (group of inhibition XV) showed a lower production of EntP and a higher production of EntL50 than *E. faecium* L50. Similarly, *E. faecium* DCH38 was a non-EntQ producer confirming previous data on the absence of the structural gene *entqA* in this strain. Nevertheless, *E. faecium* DCH38 shows an antimicrobial activity that is 66% of that of *E. faecium* L50.

3.4. Nucleotide sequencing of genes coding bacteriocins

To determine if the different production of bacteriocins and/or differences in the antimicrobial activity of the distinct

Table 4
Purification of the antimicrobial activity of *Enterococcus hirae* DCH5

Purification stage	Volume (ml)	Total A ₂₅₄ ^a	Total activity (10 ³ BU) ^b	Specific activity ^c	Increase in specific activity (fold) ^d	Yield (%)
Culture supernatant	1000	6200	5569	898	1	100
Ammonium sulphate precipitation	100	1420	9058	6379	7	162
Gel filtration chromatography	200	558	7550	13,530	15	135
Cation-exchange chromatography	50	7.05	2913	413,191	460	52
Hydrophobic interaction chromatography	10	0.73	2597	3,557,534	3961	46
Reverse phase chromatography	0.1	0.006	718	119,666,666	133,259	13

^a Absorbance at 254 nm multiplied by the volume in milliliters.

^b Antimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml) multiplied by the total volume.

^c Specific activity is the number of bacteriocin units divided by the total A₂₅₄.

^d The specific activity of a fraction divided by the specific activity of the culture supernatant.

enterococcal isolates as compared to that of the reference strains, would be attributable to subtle small polymorphic genetic differences in or near the structural gene coding mature bacteriocins, an extended PCR-generated fragment and determination of their corresponding nucleotide sequence was performed from outside structural genes coding for EntP, EntA, and EntL50 (EntL50A and EntL50B). PCR amplification of purified DNA from *E. faecium* strains, producers of EntP, with primers EntP-F/EntP-R (results not shown), generated in all but one

case, that of *E. faecium* DCH2, a 423-bp fragment, whose nucleotide sequence was identical to that of the same nucleotide fragment of the reference strain *E. faecium* P13. Similarly, PCR-amplification of purified DNA from *E. faecium* DCH2 and *E. faecium* DCC14 with primers L50J40-F/L50J40-R showed amplification of a 400-bp fragment corresponding to the *entL50A-entL50B* genes of *E. faecium* L50. However, when a PCR-nested was performed to determine the location of *entL50A-entL50B* respect to that of *E. faecium* L50, the results of

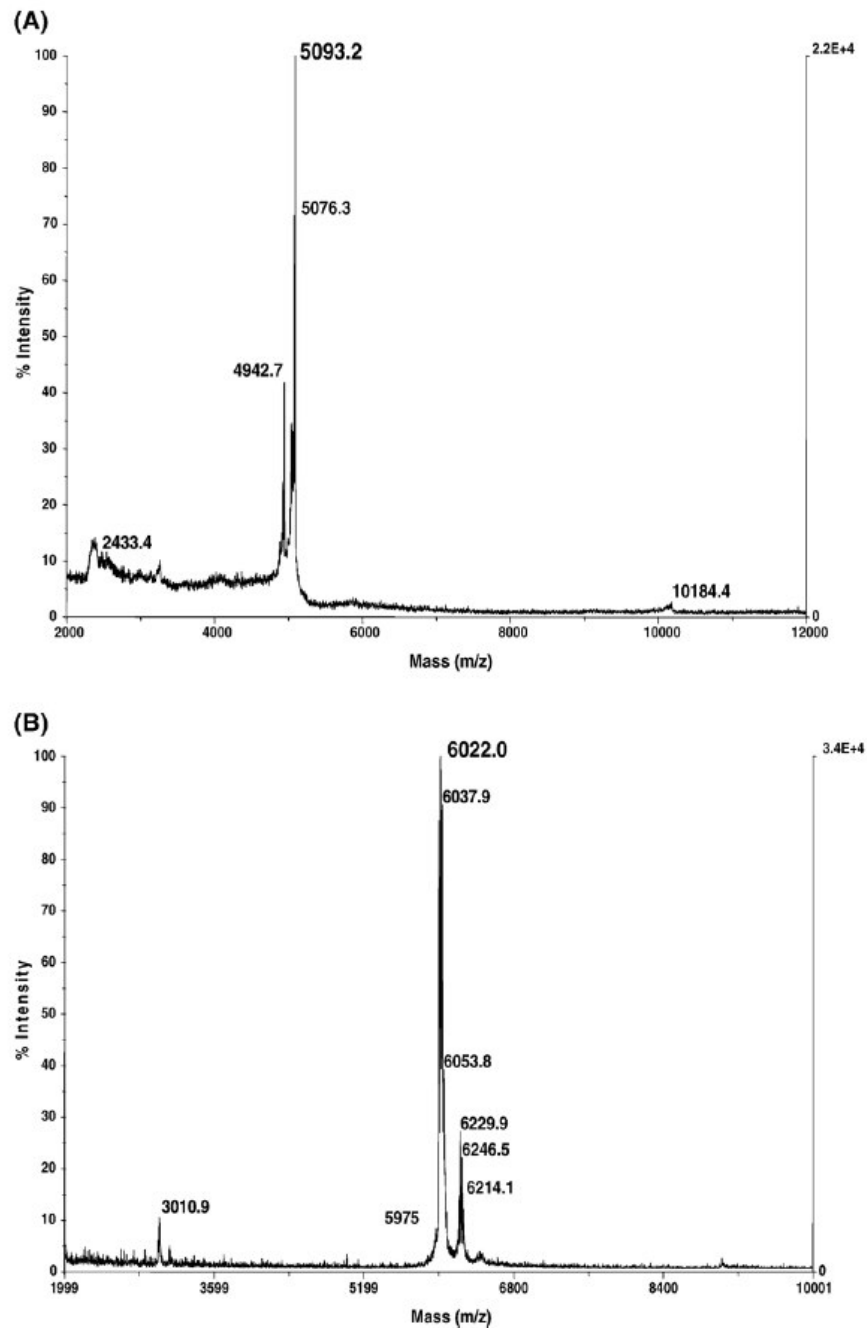


Fig. 3. Mass spectrometry analysis of the purified antimicrobial peptide of *E. hirae* DCH5 (A), and *L. garviae* DCC43 (B).

Fig. 2 suggest that *E. faecium* DCH2 do not show the nucleotide fragment corresponding to the three ORFs (*orfE*, *orfF*, *orfG*) located upstream the start codon of *entL50A*, while a weak signal suggest the possible existence downstream of *entL50B* of the two ORFs (*orfC*, *orfD*). For *E. faecium* DCC14, the *entL50A-entL50B* fragment seems to be allocated within the same genetic fragment as in *E. faecium* L50. The PCR-amplification of purified DNA from *E. faecium* strains, producers of EntA, with primers EntA-F/EntA-R (results not shown), generated in all cases a 380-bp fragment, whose nucleotide sequence was identical to that of the same nucleotide fragment of the reference strain *E. faecium* T136. PCR-amplification of purified DNA from *E. faecium* strains producers of EntP, EntL50 and EntQ, with primers EntP-F/EntP-R and L50J45-R/L5045J-R (results not shown), showed amplification of a 423-bp fragment of genes *entP-orf2* of the reference strain *E. faecium* P13, and a 450-bp fragment covering the *entL50A-entL50B* genes of *E. faecium* L50. In all cases, the nucleotide sequence of the PCR-generated 423-bp fragments and the 450-bp fragments was identical to that obtained from the *E. faecium* L50 reference strain.

3.5. Purification of the antimicrobial activity of *E. hirae* DCH5 and *L. garvieae* DCC43

The rapid genetic detection of enterocin structural genes has facilitated the recognition of enterococci as producers of bacteriocins previously described, or their consideration as producers of potentially novel bacteriocins. The narrow host range antimicrobial activity of the *Enterococcus* sp. DAC37 isolate (group VIII) precluded efforts towards purification of its antagonistic activity, while most of the *E. faecalis* isolates did not manifest a measurable antimicrobial activity in supernatants of cultures grown in MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) broth. Purification of the antimicrobial activity *E. hirae* DCH5 (group XIV), permitted an 133,259-fold increase of its specific activity and a 13% recovery of the initial antimicrobial activity (Table 4). MALDI-TOF mass spectrometry analysis of the purified antagonistic activity of *E. hirae* DCH5 showed a major peak of 5,093.2 Da, suggesting the eluted peptide was purified to homogeneity (Fig. 3A). Purification of the antagonistic activity of *L. garvieae* DCC43 also permitted the recovery of a major peak of antimicrobial activity, with an 4,099,378-fold increase of its specific activity and a final recovery of a 209% of the initial antimicrobial activity (Table 5). MALDI-TOF mass spectrometry analysis of the purified activity showed a major

peak of 6,022 Da (Fig. 3B), suggesting the eluted peptide was purified to homogeneity.

4. Discussion

A 14% (70 out of 500) of the isolates recovered from mallard ducks and selected after growth on selective media for enterococci, displayed antagonistic activity. However, other LAB such as *L. garvieae* DCC43 are isolated on media selective for enterococci, confirming their lack of sufficient selectivity (Domig et al., 2003). The *E. faecalis* isolates comprised the largest enterococcal species with antimicrobial activity (48%) followed by *E. faecium* (39%), *E. hirae* (6%), and other yet unidentified enterococcal isolates. *E. cecorum* is also a reported component of the mallards flora (Murphy et al., 2005), whereas *L. garvieae* clearly contributes to the microbial ecology of Italian fermented sausages (Rantsiou et al., 2005). A higher percentage of enterococci with antagonistic activity, and the predominance of *E. faecium* as the most active enterococcal species has been observed for enterococci isolated from wood pigeons (Martín et al., 2006).

Representative enterococci with antimicrobial activity were evaluated for the presence of genes coding bacteriocins. Well characterized enterocins produced by enterococci are the cytolysin (hemolysin-bacteriocin) precursor (Gilmore et al., 1994), enterocin AS-48 (Martínez-Bueno et al., 1994), bacteriocin 31 (Tomita et al., 1996), enterocin A (Aymerich et al., 1996), enterocin B (Casaus et al., 1997), enterocin P (Cintas et al., 1997), enterocin L50 (EntL50A and EntL50B) (Cintas et al., 1998) and enterocin Q (Cintas et al., 2000), enterocin 1071A and 1071B (Balla et al., 2000), mundticin KS (Kawamoto et al., 2002), and enterolysin A (Hickey et al., 2003; Nilsen et al., 2003). Three more enterocins characterized are enterocin SE-K4 (Eguchi et al., 2001), enterocin RJ-11 (Yamamoto et al., 2003) and enterocin EJ97 (Sánchez-Hidalgo et al., 2003). In this work, PCR-amplification of genes coding described bacteriocins has shown that amongst the antagonistic *E. faecium* isolated from mallards, 1 (8%, group VI) hold the gene *entP*, 4 (33%, groups I, II, and XIX) carry the genes *entA* and *entB*, 1 (8%, group V) hold the genes *entP*, *entA*, and *entB*, 3 (25%, groups III and XIV) carry the genes *entP*, *entL50A-entL50B*, and *entqA*, 1 (8%, group XVI) hold the genes *entP*, *entL50A-entL50B*, and *entA*, and 1 (8%, group I) hold the genes *entP*, *entL50A-entL50B*, *entA*, and *entB*. Similarly, amongst the antagonistic *E. faecalis* isolates, 2 (13%, group II) hold the gene *entL50A-entL50B*, 7 (46%, groups IV, IX, X, XI, XII, and

Table 5
Purification of the antimicrobial activity of *Lactococcus garvieae* DCC43^a

Purification stage	Volume (ml)	Total A ₂₅₄	Total activity (10 ³ BU)	Specific activity	Increase in specific activity (fold)	Yield (%)
Culture supernatant	1000	26,600	63	2.3	1	100
Ammonium sulphate precipitate	100	2550	797	312	135	1265
Gel filtration chromatography	200	1760	496	281	122	787
Cation-exchange chromatography	50	1	723	723,000	314,347	1147
Hydrophobic interaction chromatography	10	0.1	489	4,893,000	2,127,391	776
Reverse phase chromatography	0.9	0.014	132	9,428,570	4,099,378	209

^a Abbreviations as in Table 4.

XX) carry the gene *entA*, and 6 (40% groups II, VII, IX, XIII, and XVII) did not produce PCR-amplification fragments for any of the bacteriocin primers evaluated (Table 2). No isolates carrying genes *cylL_L-cylL_S*, *entAS-48*, *ent1071A-ent1071B*, *munKS*, and *bac31*, were detected. Thus, there was no correlation between the presence of known enterocin genes and the antagonistic spectrum of the isolates, although such a correlation has been found in other enterococci (Martín et al., 2006). Nevertheless, the presence of *entA*, *entB*, *entP*, *entL50A-entL50B*, and *entqA* genes, either alone or in combination with others, seems to be common in enterococci from human, animal, clinical, food, agricultural, and environmental sources (Herranz et al., 1999; Cintas et al., 2000; De Vuyst et al., 2003; Foulquié-Moreno et al., 2003; Ben Omar et al., 2004; Martín et al., 2006).

The antagonistic enterococci were further evaluated for potential virulent genes. In this study, none of the *E. faecium* strains harboured potential virulence factors, except the cell wall adhesin *efaAfm*, which agrees with others results (Eaton and Gasson, 2001; Martín et al., 2006). However, it should be noted that the lack of sex pheromones in *E. faecium* may reflect sequence divergence rather than absence of gene transfer pheromones, since sex pheromone crosstalk between *E. faecium* and *E. faecalis* has been reported (Eaton and Gasson, 2001). However, all *E. faecalis* isolates evaluated in this work carried the *efaAfs*, *cpd*, and *cef* genes, and most of them also the *cob* gene. Sex pheromone production in enterococci is not a desirable trait, since it may promote acquisition of antibiotic resistance and other linked traits from other enterococci and lead to increased virulence (Eaton and Gasson, 2001). The absence of a complete *cylMBA* fragment in the *E. faecalis* isolates evaluated may also reflect the absence of a true β -hemolysis or that the observed hemolysis is due to an still unrevealed molecule or mechanism. Others have reported the incidence of *cylMBA* in non-hemolytic *E. faecalis* strains (Eaton and Gasson, 2001), and a higher incidence of hemolytic enterococcal strains with the *cylL_L-cylL_S* gene (De Vuyst et al., 2003; Semedo et al., 2003a). Insertion/deletion events leading to truncated or absent *cyl* genes, and possible sequence divergences in genes coding for the structural subunits of the cytolysin, may also explain the difficulties to tackle genes involved in production of active cytolysins (Semedo et al., 2003b; Pillar and Gilmore, 2004). Two *E. faecalis* isolates amplified a genomic fragment of the size of the *agg* gene, while only *E. faecalis* DBC4 carried *esp*. This result contrasts with others in which 33 to 36% of the *E. faecalis* isolates of food origin produced the cell-wall associated protein Esp (Eaton and Gasson, 2001; Franz et al., 2001). The absence of *esp* is, nevertheless, a positive attribute for *E. faecalis*. All *E. faecalis* strains harbour more virulence determinants than do the *E. faecium* strains, and the existence of multiple virulence factors in *E. faecalis* may contribute to the competitiveness of such potentially pathogenic enterococci in mallards. However, neither *Enterococcus* sp. DAC37, nor *E. hirae* DCH5 and *E. hirae* DCH6 and *L. garvieae* DCC43 carried any of the potential virulence factors examined. A specific cause for concern and contributing factor to pathogenesis of enterococci is their resistance to a wide variety of antibiotics. However,

most of the enterococci evaluated in this study are susceptible to most clinically relevant antibiotics.

Evaluation of the production and functional expression of bacteriocins by *E. faecium* (Table 3), revealed that *E. faecium* DCH2 and *E. faecium* DCC14 were silent for production of EntL50 (EntL50A and EntL50B) and EntA. Although nucleotide sequencing did not reveal polymorphic differences in or near *entL50A-entL50B* and *entA* genes, PCR-nested experiences (Fig. 2) suggest that *E. faecium* DCH2 does not hold the three tightly clustered ORFs (*orfE*, *orfF*, and *orfG*), presumably involved in processing and secretion of EntL50 in *E. faecium* L50 (Cintas et al., 1998). The low production of EntP by *E. faecium* DCH2, as compared to that of the control strains *E. faecium* P13 and *E. faecium* L50, may be assigned to the absence of a 423-bp *entP-orf2*-derived fragment in *E. faecium* DCH2, which suggest that genetic modifications of the promoter region of *entP* may affect transcription, while those in *orf2* may affect immunity/transport of EntP. Indeed different expression levels of bacteriocins may be a result of promoter activity. These modifications do not constitute unusual situations in LAB (Martín et al., 2006). Meanwhile, the higher antimicrobial activity of *E. faecium* DEC7, *E. faecium* DEC8, and *E. faecium* DDC28, lower producers of EntA than the control *E. faecium* T136, may suggest that they are producers of a more stable EntA or producers of still unknown bacteriocins. The co-production of EntA and EntP by *E. faecium* DAC2 generates supernatants with a higher antagonistic activity than that of the control *E. faecium* P13 and *E. faecium* T136, while the lower production of EntP by *E. faecium* DAC7 may reflect phenotypic and genetic diversity among enterococcal strains affecting production of bacteriocins. All evaluated isolates carrying the genes *entP*, *entL50A-entL50B*, and *entqA*, were producers of enterocins at concentrations similar to that of the reference strain *E. faecium* L50. Differences in bacteriocin production and antimicrobial activity among such isolates may be reasonably ascribed to their multiple bacteriocin production, phenotypic and genetic diversity of the bacteriocinogenic strains, and to still unknown factors (Gutiérrez et al., 2004; Martín et al., 2006). The occurrence of several enterocin structural genes in the *E. faecium* isolates does not always correlate with a higher bacteriocin activity in their supernatants.

The rapid determination of the absence of genes coding known enterocins permits detection of isolates potentially producing novel bacteriocins. Relevant to this study has been the observation that most *E. faecalis*, except *E. faecalis* DBH18 and *E. faecalis* DBH20, showed a potent direct antimicrobial activity (Table 3), but no activity was detected in supernatants of producer cells. Although the antagonistic activity of *E. faecalis* isolates producing EntA is detected only in solid media (Nilsen et al., 2003), and *E. faecalis* cells express cytolysin by a quorum-sensing mechanism in response to target cells (Coburn et al., 2004), further studies should be directed towards a deeper elucidation of the antimicrobial and hemolytic activity of the antagonistic *E. faecalis* strains isolated from mallards. The linkage of production of antimicrobial substances to other virulence factors may contribute to the competitiveness of virulent *E. faecalis* in food and the gastrointestinal tract.

In this study, purification to homogeneity of the antimicrobial activity of *E. hirae* DCH5 revealed the presence of a major antagonistic peptide of 5093 Da (Fig. 3A), whereas purification of the antimicrobial activity of *L. garvieae* DCC43 revealed an antagonistic peptide with a molecular mass of 6022 Da (Fig. 3B). This purification procedure has permitted purification to homogeneity of many bacteriocins, including most known enterocins (Aymerich et al., 1996; Cintas et al., 2000; Gutiérrez et al., 2004), although it was not appropriate for purification of the antimicrobial compound(s) of *E. columbae* PLCH2 (Martín et al., 2006). A bacteriocin, designated hiraecin S, not purified to homogeneity, has been reported to be produced by *E. hirae* C311 isolated from bovine faeces (Siragusa, 1992). Garviecin L1-5 with a molecular weight of about 2.5 kDa is produced by *L. garvieae* L1-5, isolated from bovine milk (Villani et al., 2001). Further work is in progress to determine the primary structure of the bacteriocins produced by *E. hirae* DCH5 and *L. garvieae* DCC43 by combined amino acid and DNA sequencing.

Mallard ducks hold in their intestinal content and carcasses a diverse enterococcal population with antimicrobial activity. Bacteriocinogenic *E. faecium* and *E. hirae* isolates may be considered hygienic due to production of enterocins, and potentially safe for their low incidence of potential virulence genes and susceptibility to most clinically relevant antibiotics. However, the presence among the enterococci of *E. faecalis* strains with a potent antagonistic activity and multiple virulence factors, gives the enterococci a possible concern regarding their potential pathogenicity for immunocompromised persons. In the sake of a good microbiological practice, it should be proposed not to feed the consumer with high levels of virulence factor-loaded enterococci (Martín et al., 2006). Accordingly, it should be recommended that mallards and other small game be eviscerated and defeathered longer before consumption. Nevertheless, some of the antagonistic enterococci and their enterocins evaluated in this study may find potential applications in the food and feed industry as producers of natural antimicrobial compounds, for production of food ingredients with antimicrobial activity, and for their evaluation as protective cultures and/or probiotics, provided their hygienic and safety status is further evaluated.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to Mr. Fernando Fuster-Palacios, a good hunter from Almenara (Castellón, Spain) and to "Antonio de Miguel, Alimentos Selectos", Pinto (Madrid, Spain) for providing the mallards used in this study. We also thank Dr. Tracy Eaton, Institute of Food Research, Norwich (UK) and Dr. P. Courvalin, Institut Pasteur, Paris (France) for sending control strains. This work was partially supported by grants AGL2003-01508 and AGL2006-01042 from the Ministerio de Educación y Cultura (MEC), and by grant S-0505/AGR/0265 from the Comunidad de Madrid, Spain. J. Sánchez holds a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD). A. Basanta is recipient of a fellowship from the Comunidad de Madrid, Spain.

References

- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, N., I.F., 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1676–1682.
- Balla, E., Dicks, L.M.T., du Toit, M., van der Merwe, M.J., Holzapfel, W.H., 2000. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1298–1304.
- Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M.K., Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Pérez, R., Martínez, M., Gálvez, A., 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 118–130.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E., Holo, H., 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143, 2287–2294.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E., Nes, I.F., 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4321–4330.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F., Håvarstein, L.S., 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180, 1988–1994.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F., 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182, 6806–6814.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernández, P.E., 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 7, 281–305.
- Coburn, P.S., Pillar, C.M., Jett, B.D., Haas, W., Gilmore, M., 2004. *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin. *Science* 306, 2270–2272.
- Cocconcelli, P.S., Cattivelli, D., Gazzola, S., 2003. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistance among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 315–323.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev.* 3, 777–788.
- Criado, R., Gutiérrez, J., Martín, M., Herranz, C., Hernández, P.E., Cintas, L.M., 2006. Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7634–7643.
- Dargere, S., Vergnaud, M., Verdon, R., Saloux, E., Le Page, O., Leclercq, R., Bazin, C., 2002. *Enterococcus gallinarum* endocarditis occurring on native heart valves. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2308–2310.
- De Vuyst, L., Foulquie, M.R., Reverts, H., 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 299–318.
- Domig, K.J., Mayer, H.K., Kneifel, W., 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 147–164.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J., 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1628–1635.
- Eguchi, T., Kaminaka, K., Shima, J., Kanamoto, K., Mori, Choi, S.H., Ohmono, S., Ogata, S., 2001. Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by a thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 247–253.
- Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., Nissen-Meyer, J., 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Peptide Sci.* 11, 688–696.
- Foulquié-Moreno, M.R., Callawaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J., De Vuyst, L., 2003. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.* 94, 214–229.
- Foulquié-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2005. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 1–24.

- Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silverhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancannet, M., Swings, J., Holzapfel, W.H., 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4385–4389.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleiffer, K.H., Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foods — a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 105–122.
- Gilmore, M.S., Segarra, R.A., Booth, M.C., Bogie, C.P., Hall, L.S., Clewell, D.B., 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD-1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176, 7335–7344.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Citti, R., Martín, M., Herranz, C., Fernández, M.F., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2004. Performance and applications of polyclonal anti-peptide antibodies with specificity for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2247–2255.
- Gutiérrez, J., Larsen, R., Cintas, L.M., Kok, J., Hernández, P.E., 2006. High-level heterologous production and functional expression of the *sec*-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 41–51.
- Herranz, C., Mukhopadhyay, S., Casaus, P., Martínez, J.M., Rodríguez, J.M., Nes, I.F., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 1999. Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. *Curr. Microbiol.* 39, 282–290.
- Hickey, R.M., Twomey, D.P., Ross, R.P., Hill, C., 2003. Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology* 149, 665–664.
- Higashide, T., Takahashi, M., Kobayashi, A., Ohkubo, S., Sakurai, M., Shirao, Y., Tamura, T., Sugiyama, K., 2005. Endophthalmitis caused by *Enterococcus mundtii*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1475–1476.
- Kawamoto, S., Shima, S., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Sameshima, T., 2002. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7973. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3830–3840.
- Kayser, F.H., 2003. Safety aspects of enterococci from the medicinal point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 255–262.
- Lu, H.Z., Weng, X.H., Li, H., Yin, Y.K., Pang, M.Y., Tang, Y.W., 2002. *Enterococcus faecium*-related outbreak with molecular evidence of transmission from pigs to humans. *J. Clin. Microbiol.* 40, 913–917.
- Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, M.T., 2005. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1177–1190.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2006. Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Prot.* 69, 520–531.
- Martínez, J.M., Kok, J., Sanders, J.W., Hernández, P.E., 2000. Heterologous co-production of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3543–3549.
- Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Samyn, B., van Beeumen, J., Goyette, J., Valdivia, E., 1994. Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* 176, 6344–6339.
- Murphy, J., Devane, M.L., Robson, B., Gilpin, B.J., 2005. Genotypic characterization of bacteria cultured from duck faeces. *J. Appl. Microbiol.* 99, 301–309.
- Nallapareddy, N., Wenxiang, H., Weinstock, G.M., Murray, B., 2005. Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. *J. Bacteriol.* 187, 5709–5718.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth Informational Supplement., vol. 21. NCCLS, Villanova, Pa.
- Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H., 2003. Enterolysin A, a cell-wall degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2975–2984.
- Pappas, G., Liberopoulos, E., Tsianos, E., Elisaf, M., 2004. *Enterococcus casseliflavus* bacteremia. Case report and literature review. *J. Infect.* 48, 206–208.
- Pillar, C.M., Gilmore, M.S., 2004. Enterococcal virulence — pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. *Front. Biosci.* 9, 2335–2346.
- Poyart, C., Lambert, T., Morand, P., Abassade, P., Quesne, G., Baudouy, Y., Trieu-Cuot, P., 2002. Native valve endocarditis due to *Enterococcus hirae*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2689–2690.
- Rantsiou, K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G., Coccolin, L., 2005. Culture-dependent and culture-independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1977–1986.
- Saavedra, L., Tarant, M.P., Sesma, F., Font de Valdez, G., 2003. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 241–245.
- Sánchez-Hidalgo, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., 2003. The genes coding for enterocin E97J production by *Enterococcus faecalis* E97 are located on a conjugative plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1633–1641.
- Semedo, T., Almeida Santos, M., Silva Lopes, M.F., Figueiredo Marqués, J.J., Barreto Crespo, M.T., Tenreiro, R., 2003a. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 13–22.
- Semedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M.F., Figueiredo Marqués, J.J., Tenreiro, R., Barreto Crespo, M.T., 2003b. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 2569–2576.
- Shankar, N., Baghdagan, A.S., Gilmore, M.S., 2002. Modification of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 417, 746–750.
- Siragusa, G.R., 1992. Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus hirae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3508–3513.
- Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., Ike, Y., 1996. Cloning and characterization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-response conjugative plasmid pY117. *J. Bacteriol.* 178, 3585–3593.
- Villani, F., Aponte, M., Baioatta, G., Muriello, G., Pepe, O., Moschetti, G., 2001. Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garviae* isolated from raw cow's milk. *J. Appl. Microbiol.* 90, 430–439.
- Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M., Okazaki, M., 2003. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5746–5753.
- Yousif, N.M.K., Dawyndt, P., Abriouel, H., Wilaya, A., Schillinger, U., Vancannet, M., Swings, J., Dirar, H.A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2005. Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from “Hussuva”, an African fermented sorghum product. *J. Appl. Microbiol.* 98, 216–228.

CAPÍTULO IV
DETERMINACIÓN DE LA
SECUENCIA AMINOACÍDICA Y
NUCLEOTÍDICA DE LA HIRACINA
JM79, UNA BACTERIOCINA SEC-
DEPENDIENTE PRODUCIDA POR
Enterococcus hirae DCH5

CHAPTER IV
AMINO ACID AND NUCLEOTIDE
SEQUENCE, ADJACENT GENES,
AND HETEROLOGOUS
EXPRESSION OF HIRACIN JM79, A
SEC-DEPENDENT BACTERIOCIN
PRODUCED BY *Enterococcus hirae*
DCH5, ISOLATED FROM MALLARD
DUCKS (*Anas platyrhynchos*)

Artículo publicado en el FEMS Microbiology Letters

Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*)

Jorge Sánchez¹, Dzung B. Diep², Carmen Herranz¹, Ingolf F. Nes², Luis M. Cintas¹ & Pablo E. Hernández¹

¹Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; and

²Laboratory of Microbial Gene Technology, Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway

Correspondence: Pablo E. Hernández, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3943752; fax: +34 91 3943743; e-mail: ehernan@vet.ucm.es

Received 18 September 2006; revised 16 January 2007; accepted 26 January 2007.
First published online 26 February 2007.

DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00673.x

Editor: Oscar Kuipers

Keywords

hiracin JM79; *Enterococcus hirae*; mallard ducks (*Anas platyrhynchos*); heterologous production.

Abstract

The primary structure of a bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5 was determined by combined amino acid and DNA sequencing. Nucleotide analysis of a 2838-bp DNA fragment of *E. hirae* DCH5 revealed five putative ORFs. The first *orf* (*hirJM79*) encodes a 74-amino-acid peptide containing an N-terminal signal peptide of 30 amino acids, followed by the amino acid sequence of the mature bacteriocin, hiracin JM79 (*HirJM79*), of 44 amino acids. The second *orf* (*hiriJM79*) encodes the putative immunity protein of *HirJM79*. Contiguous ORFs encode a putative mobilization protein (*orfC*), a relaxase/mobilization nuclease domain (*orfD*), and a hypothetical protein (*orfE*). The production and functional expression of *HirJM79* by heterologous hosts suggest that *hirJM79* is the minimum requirement for production of biologically active *HirJM79*, that *HirJM79* is most likely externalized by the general secretory pathway or *sec*-dependent pathway, and that *HiriJM79* is the immunity protein for *HirJM79*.

Introduction

Enterococci are widespread in nature and constitute an essential part of the endogenous gut microbiota of humans and animals. However, their presence in food is controversial: enterococci are considered as indicators of faecal contamination and responsible for food spoilage, but also beneficial for their potential use as starter cultures in food fermentation, their use as probiotics, and their ability to produce ribosomally synthesized antimicrobial peptides generally referred to as bacteriocins (Cintas *et al.*, 2001; Eijssink *et al.*, 2002). Bacteriocin-producing lactic acid bacteria (LAB), including enterococci, are widespread in nature (Foulquié-Moreno *et al.*, 2005), and since bacteriocins may inhibit Gram-positive food-spoilage and food-borne pathogenic bacteria, they are an important choice as natural and nontoxic food preservatives (Cotter *et al.*, 2005). Most bacteriocins from LAB are synthesized as biologically inactive prepeptides containing an N-terminal extension. The mature peptides are often cationic, amphiphilic, membrane-permeabilizing molecules, and are classified into two main

classes. Class I consists of modified bacteriocins, the lantibiotics. Class II is comprised of nonmodified, heat-stable bacteriocins, which are divided into subclasses IIa (pediocin-like, strong antilisterial bacteriocins), IIb (two-peptide bacteriocins), IIc (cyclic structures), and IId (other peptide bacteriocins) (Cotter *et al.*, 2005; Fimland *et al.*, 2005). The N-terminal extensions of the prepeptide of some lantibiotics and most nonlantibiotics are of the so-called double-glycine type (leader sequence) and are cleaved off concomitantly with export across the cytoplasmic membrane by dedicated ABC-transporters and their accessory proteins (Håvarstein *et al.*, 1995). However, some class II bacteriocins contain N-terminal extensions of the so-called *sec*-type (signal peptide), which are proteolytically cleaved concomitantly with bacteriocin externalization by the general secretory pathway or *sec*-dependent pathway (Van Wely *et al.*, 2001; Herranz & Driessen, 2005).

Enterococci in food may be beneficial by producing antimicrobial agents and by improving the perceptible quality of food for consumers. They may also represent a concern because of nosocomial and opportunistic infections.

The safety of foods containing enterococci is an issue that the food industry must carefully address (Martín *et al.*, 2006). Thus, it is of interest to evaluate the hygienic and safety aspects related to the presence of enterococci in wild animal species suitable for human consumption. Enterococci isolated from carcasses and the intestinal content of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) have been evaluated with respect to antimicrobial compounds, the presence of genes encoding bacteriocins and their expression, and potential virulence factors. *Enterococcus hirae* DCH5 was considered safe due to its antagonistic activity, the absence of virulence genes, and susceptibility to most clinically relevant antibiotics. Purification of the antimicrobial activity of *E. hirae* DCH5 resulted in a single peptide absorbance peak, which after MALDI-TOF MS analysis showed a major mass peak of 5093.2 Da, suggesting that the antagonistic peptide was purified to homogeneity (J. Sánchez, A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L.M. Cintas, and P.E. Hernández, submitted for publication). This study reports the amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of a *sec*-dependent bacteriocin produced by *E. hirae* DCH5.

Materials and methods

Bacterial strains and media, and growth conditions

The bacteriocin producer *E. hirae* DCH5 was isolated from wild Mallard ducks (*A. platyrhynchos*), and identified using genus- and species-specific PCR primers (J. Sánchez, A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L.M. Cintas, and P.E. Hernández, submitted for publication), and by comparing its whole-cell protein profile with protein profiles of LAB previously described by Marc Vancanneyt, University of Ghent (BCCM/LMG Culture Collection, Ghent, Belgium). *Enterococcus faecium* T136 (Casaus *et al.*, 1997), other LAB, and food-spoilage and food-borne pathogenic bacteria were used as indicators of the antimicrobial activity of *E. hirae* DCH5 (Table 1). All LAB strains were grown in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 32 °C. *Listeria* spp. and *Staphylococcus* spp. were propagated in brain heart infusion (BHI) medium (Oxoid) at 32 °C. *Propionibacterium* spp. and *Clostridium* spp. were propagated in BHI medium (Oxoid) at 32 and 37 °C, respectively, in anaerobic jars. *Brocothrix thermosphacta* and *Pseudomonas fluorescens* were grown in tryptone soya broth (TSB) medium (Oxoid) at 32 °C. *Lactobacillus sakei* Lb790 (Schillinger & Lucke, 1989), *Enterococcus faecalis* JH2-2 (Jacob & Hobbs, 1974), and *E. faecium* L50/14-2 (Criado *et al.*, 2006) were also propagated in MRS broth at 32 °C, while *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 (Chopin *et al.*, 1984) was propagated in M17 broth (Oxoid) supplemented

with 0.5% (w/v) glucose (GM17) at 32 °C. Transformants of *Lactococcus lactis* IL1403, *Lactobacillus sakei* Lb790, *E. faecalis* JH2-2, and *E. faecium* L50/14-2 were selected with 5 µg mL⁻¹ of chloramphenicol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Cell-free culture supernatants were obtained by centrifugation of *E. hirae* DCH5 at 12 000 g at 4 °C for 10 min, adjusted to pH 6.2 with 1 M NaOH, filtered through 0.25 µm pore-size sterile syringe filters (Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK), and stored at -20 °C. The antagonistic activity of *E. hirae* DCH5 was evaluated by the agar diffusion test (ADT) and, when stated, by a microtiter plate assay (MPA), performed as previously described (Cintas *et al.*, 2000).

Amino acid and nucleotide sequencing of the bacteriocin produced by *E. hirae* DCH5, and adjacent genes

The purified antimicrobial activity of *E. hirae* DCH5 was subjected to N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation, using a 477A automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) with an on-line 120A phenylthiohydantoin amino acid analyser. For DNA sequencing, total DNA from *E. hirae* DCH5 was obtained using Advamax beads (Advanced Genetic Technologies Corp., Gaithersburg, MD), digested with the blunt-end restriction enzymes BsaAI, EcoRV, PvuII and DraI (New England BioLabs, Beverly, MA), and ligated to the EcoRV-digested pCR-Blunt II-TOPO sequencing vector (Invitrogen Life Technologies, Norway). These ligation mixtures were used as templates for PCRs, which were carried out with combinations of degenerate primers based on the deduced N-terminal amino acid sequence of the purified antimicrobial peptide of *E. hirae* DCH5, and a vector-specific primer (Table 2). The PCR-generated fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis, purified using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), and sequenced with an ABI PRISM BigDyeTM Terminator cycle sequencing reaction kit, and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Homology searches of the DNA sequences were performed with the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1997) available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). For isolation and purification of resident plasmids, cultures of *E. hirae* DCH5 and *Lactococcus lactis* IL1430 were processed with the QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN) and the QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN), as described by the manufacturer, with addition of lysozyme (40 mg mL⁻¹) and mutanolysin (500 U mL⁻¹).

Cloning of the bacteriocin produced by *E. hirae* DCH5

Total DNA from *E. hirae* DCH5 was isolated using the Wizard[®] DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI).

Table 1. Antimicrobial activity and inhibitory spectrum of the supernatant and the purified bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5

Indicator strains	Source	Sensitivity to the bacteriocin*	
		Supernatant	Purified fraction†
<i>Lactobacillus reuteri</i> 20016	DSM	—‡	—
<i>Lactobacillus helveticus</i> 15009	ATCC	6.9	11.3
<i>Lactobacillus curvatus</i> 2739	NCFB	—	8.6
<i>Lactobacillus casei</i> 334	ATCC	—	—
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 11842	ATCC	—	10.6
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4356	ATCC	—	—
<i>Lactobacillus sakei</i> 2714	NCFB	—	8.6
<i>Lactococcus lactis</i> BB24	DNBTA	—	—
<i>Pediococcus acidilactici</i> 347	DNBTA	—	—
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB61	TNO	—	9.7
<i>Enterococcus faecium</i> P13	DNBTA	12.3	15.9
<i>Enterococcus faecium</i> L50	DNBTA	10.4	16.3
<i>Enterococcus faecium</i> T136	DNBTA	17.1	21.6
<i>Enterococcus faecalis</i> INIA4	INIA	13.5	17.9
<i>Enterococcus faecalis</i> P ₄	IFR	9.9	13.5
<i>Enterococcus faecalis</i> F ₂	IFR	—	9.6
<i>Enterococcus faecalis</i> P ₃₆	IFR	9.4	15.0
<i>Propionibacterium</i> sp. P4	NCDO	10.4	16.3
<i>Propionibacterium</i> sp. P6	NCDO	12.5	18.1
<i>Propionibacterium acidipropionici</i> 563	NCDO	9.8	13.3
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> 3,5 CT	TNO	—	—
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> 1754	NCDO	8.8	9.3
<i>Clostridium perfringens</i> 376	CECT	—	—
<i>Clostridium botulinum</i> 551	CECT	11.1	17.0
<i>Listeria monocytogenes</i> 911	CECT	12.0	16.2
<i>Listeria monocytogenes</i> 932	CECT	12.4	15.4
<i>Listeria monocytogenes</i> 935	CECT	11.1	15.5
<i>Listeria monocytogenes</i> 4031	CECT	13.2	19.2
<i>Listeria monocytogenes</i> 4032	CECT	12.3	17.2
<i>Listeria ivanovii</i> 913	CECT	13.7	17.9
<i>Listeria seeligeri</i> 917	CECT	13.2	18.5
<i>Listeria welshimeri</i> 919	CECT	9.6	15.9
<i>Listeria grayi</i> 931	CECT	12.5	16.4
<i>Staphylococcus aureus</i> 137	FRI	12.9	17.0
<i>Staphylococcus aureus</i> 196E	FRI	13.2	16.7
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 378	CECT	—	—
<i>Brochothrix thermosphacta</i> 847	CECT	—	—

*Diameter of halos of inhibition (mm) by the ADT.

†Purified to homogeneity as described (J. Sánchez, A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L.M. Cintas, and P.E. Hernández, submitted for publication) and diluted eightfold.

‡Antimicrobial activity not detected.

ATCC, American Type Culture Collection (Rockville); CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain); DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain); DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GMBH (Braunschweig, Germany); FRI, Food Research Institute (Madison); IFR, Institute of Food Research (Norwich, UK); INIA, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (Madrid, Spain); NCDO, National Collection of Dairy Organisms (Reading, UK); NCFB, National Collection of Food Bacteria (Reading, UK); TNO, Nutrition and Food Research (Zeist, the Netherlands).

Plasmid pMG36c (Van de Guchte *et al.*, 1989) was used as the expression plasmid for cloning of the *E. hirae* DCH5 structural gene (*hirJM79*) coding the bacteriocin HirJM79, with or without its putative immunity gene (*hiriJM79*). The primers and inserts used for construction of the recombi-

nant plasmids are listed in Table 3. Derivatives of plasmid pMG36c were constructed as follows. Primers HirA-F and HirA-R were used to amplify a 711-bp (fragment THi) carrying the structural (*hirJM79*), and putative immunity (*hiriJM79*) genes of HirJM79 from total DNA of *E. hirae*

Table 2. Oligonucleotides used in DNA sequencing

Oligonucleotide	Nucleotide sequence (5' → 3')*	Comments
Jos1R	GCWGGNTATTATGNAATGGNRTWTATTG	Degenerate primer
Jos2F	AATAAGAAAAATGTTGGGTWGTGGAA	Degenerate primer
Jos3R	GCTAAGGNGAAATWGGNAAATWATWG	Degenerate primer
Jos4F	GGNAAAATWATWGTWAATGGNTGGGT	Degenerate primer
Jos8F	GARAAATGYTGGGTWGTGGAA	Degenerate primer
Jos9R	GGNAAAATWATWGTWAARGGNTGGGT	Degenerate primer
J10R	GCACCTAGAAGGTAGTGGTAGG	Specific primer
J11R	GGTGGGTAAATCATGGTCCATG	Specific primer
J12F	GAGCATATCCACAATCACATTGTC	Specific primer
J13F	GAAGCAGTCAGCTGAAGCTTGC	Specific primer
M13R	GTCATAGCTGTTTCCTG	Specific primer of pCR-Blunt II-TOPO

*W: A or T; N: G, A, T or C; R: A or G; Y: C or T.

Table 3. Primers and plasmids used for heterologous expression of hiracin JM79 in *Lactococcus lactis*

Primer or plasmid	Description* or nucleotide sequence (5' → 3')	Comments, source or reference†
Primers		
HirA-F	TGAATTCAAAACACTCTTTTATGACG	Amplification of Thi
HirA-R	TGGGACTGATGAATCAGAATTG	Amplification of Thi
HPJ-F	CATAGAGCTCTGTAAAGGAGGATTTTGAAATGAAAAGAAAGTATTAAACATTG	Amplification of HE and HEi
HPJE-R	ATAAGTTAAGCTTGACTACCTTCAGGTGCCCATGGACC	Amplification of HE
HPJEI-R	ATAAGTTAAGCTTGATTAACTC CAAATACCAATAGAAGCCCATC	Amplification of HEi
Plasmids		
pMG36c	Cm ^r , pMG36e derivative	RUG-MG Van de Guchte <i>et al.</i> (1989)
pJPH1	Cm ^r , pMG36c derivative carrying the PCR product HE (RBS and <i>hirJM79</i>) under control of P ₃₂	This work
pJPH2	Cm ^r , pMG36c derivative carrying the PCR product HEi (RBS, <i>hirJM79</i> and <i>hirJM79</i>) under control of P ₃₂	This work

*Cleavage site for restriction enzymes is underlined in the primers; RBS is shown in bold; Cm^r, chloramphenicol resistance.

†Rug-MG, Department of Molecular Genetics, University of Groningen (Haren, the Netherlands).

DCH5. Primers HPJ-F and HPJE-R were used for PCR-amplification, from fragment Thi, of a 270-bp SacI–HindIII fragment (insert HE) containing the P₃₂ and ribosomal binding site (RBS) of pMG36c and *hirJM79*. Primers HPJ-F and HPJEI-R were used for PCR-amplification, from the same DNA target, of a 577-bp SacI–HindIII fragment (insert HEi), containing the P₃₂ and RBS of pMG36c and the *hirJM79* and *hirJM79* genes. Fragments HE and HEi were digested with the indicated restriction enzymes and inserted in pMG36c cut with the same enzymes. The ligation mixtures were used to transform competent *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 cells according to the method of Holo & Nes (1989), with a Gene Pulser™ and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The proper clones, containing pJPH1 (*hirJM79*) or pJPH2 (*hirJM79*+*hirJM79*), were checked for bacteriocin production, PCR, and sequencing of the inserts. The control and recombinant plasmids were reisolated from *Lactococcus lactis* IL1430 and then transferred to *Lactobacillus sakei*

Lb790, *E. faecalis* JH2-2, and *E. faecium* L50/14-2 by electroporation as previously described (Holo & Nes, 1989; Aukrust *et al.*, 1995).

Results

Antimicrobial spectrum of the bacteriocin produced by *E. hirae* DCH5

When cell-free culture supernatants and the purified bacteriocin produced by *E. hirae* DCH5 were tested against different indicator microorganisms, most of them were sensitive to their antagonistic activity, the antimicrobial effect of the purified bacteriocin was higher, and the number of sensitive indicators larger (Table 1). None of the Gram-negative bacteria tested were sensitive to the antagonistic activity of *E. hirae* DCH5. However, the bacteriocin produced by *E. hirae* DCH5 inhibits a diverse number of food-spoilage and food-borne pathogenic bacteria

including *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*.

Amino acid and nucleotide sequence of the bacteriocin produced by *E. hirae* DCH5, and adjacent genes

Determination of the N-terminal amino acid sequence of the purified bacteriocin of *E. hirae* DCH5 by Edman degradation permitted the obtention of the following peptide sequence: AGYYGNGLYCNKEKCVDXNXAKGEIG KIIVNGXVNXGPXAP. The X at positions 16, 19, 21, 34, 37 and 40 indicate blank cycles in which no amino acid derivative was detected. After 42 steps, the unambiguous amino acid sequence was not achieved due to weak reaction signals. The nucleotide sequencing of ligation mixtures permitted the elucidation of a DNA sequence, of 2838 contiguous nucleotides, containing the gene of the bacteriocin produced by *E. hirae* DCH5. Analysis of the nucleotide sequence, given the GenBank accession number DQ664500, revealed the presence of five putative ORFs designated *hirJM79*, *hirijM79*, *orfC* and *orfD*, plus one incompletely sequenced *orfE* (*orfE*) (Fig. 1).

The first *orf*, termed *hirJM79*, encodes a 74-amino-acid protein containing a 30-amino-acid N-terminal peptide followed by the amino acid sequence of the purified bacteriocin, hiracin JM79 (HirJM79), of 44 amino acids (Fig. 2). The molecular weight of mature HirJM79 was calculated to be 5093.7 which is almost identical to the MALDI-TOF MS data of the purified bacteriocin (5093.2). The ATG start codon is preceded by a potential RBS, and a -10 and -35 consensus promoter region. Two sets of inverted repeats rich in AT were also present in the promoter region, and may serve as putative binding sites for transcriptional regulators (Cintas *et al.*, 1997). A second *orf*, denominated *hirijM79*, encoding a protein of 95 amino acids was identified 20 nucleotides downstream of the stop codon of *hirJM79*. The ATG start codon is preceded by a potential RBS, and this *orf* probably encodes the putative immunity protein of HirJM79 as it is located immediately downstream of the structural gene *hirJM79*, which is a common feature of LAB bacteriocin operons (Nes *et al.*, 1996). The third *orf*, *orfC*, located c. 430 bp downstream of the stop codon of

hirijM79, encodes a putative 129-amino-acid protein. The fourth *orf*, *orfD*, located c. 800 bp downstream of the stop codon of *hirijM79* and overlapping with the end of *orfC*, encodes a protein of 304 amino acids. The incompletely sequenced *orfE*, situated c. 1960-bp downstream of the stop codon of *hirijM79*, displays a 100% identity with the first 26 amino acid residues of a hypothetical protein of 229 amino acids, as reported in *E. faecium* DO (GenBank, accession number AAK03000087).

Heterologous production and functional expression of hiracin JM79 in *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, *E. faecalis*, and *E. faecium*

When derivatives of plasmid pMG36c, termed pJPH1 (*hirJM79*) and pJPH2 (*hirJM79*+*hirijM79*), carrying the structural and the structural plus the putative immunity genes of HirJM79, respectively, were used to transform competent *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 cells resistant to HirJM79 (Hir^R), it was observed that while supernatants of the control strain *Lactococcus lactis* IL1403 (pMG36c) did not exert an antagonistic effect, the supernatants of the recombinant *Lactococcus lactis* IL1403 (pJPH1) and *Lactococcus lactis* IL1403 (pJPH2) hosts showed a potent antimicrobial activity against *E. faecium* T136 (Fig. 3a). The halos of inhibition produced by *Lactococcus lactis* IL1403 derivatives, carrying either pJPH1 or pJPH2, were similar to those produced by *E. hirae* DCH5, producer of HirJM79, and of *E. faecium* P13, producer of enterocin P (EntP). Similarly, when the recombinant plasmids from the *Lactococcus lactis* IL1403 derivatives were transferred to *Lactobacillus sakei* Lb790, also a Hir^R strain, the supernatants of *Lactobacillus sakei* Lb790 (pJPH1) and *Lactobacillus sakei* Lb790 (pJPH2), also showed a defined antagonistic activity against *E. faecium* T136 (Fig. 3a).

However, when the recombinant plasmids pJPH1 and pJPH2 were transferred to *E. faecalis* JH2-2 and *E. faecium* L50/14-2, both sensitive to HirJM79 (Hir^S), only transformed cells derived from pJPH2 (*hirJM79*+*hirijM79*) but not from pJPH1 (*hirJM79*) were obtained. The halos of inhibition produced by *E. faecalis* (pJPH2) and *E. faecium* L50/14-2 (pJPH2), were similar or even greater than those produced by the *Lactococcus lactis* (Hir^R) and *Lactobacillus*

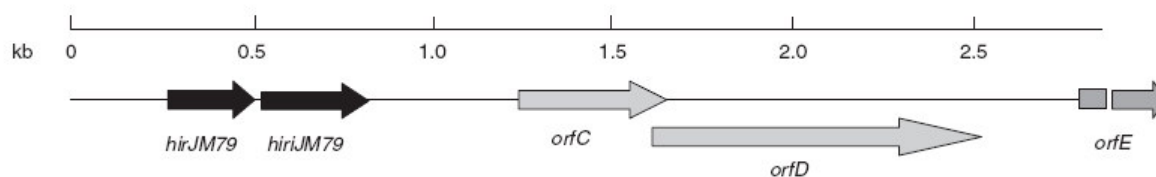


Fig. 1. Genetic organization of the 2838-bp DNA sequence from *Enterococcus hirae* DCH5 containing the hiracin JM79 structural gene (*hirJM79*), the putative hiracin JM79 immunity gene (*hirijM79*), and contiguous ORFs. The *orfE* refers to the incompletely sequenced ORF.


```

1      TGATCTTATAATTTTATTTAAACGATTATGAATTCAAAACACTCTTTTATGACGTTAATC
      IR11
61     ATTGTTATATAATAAAATGTTATATAATAAAATTAAGATTATTTAATATAACAAGCA
      IR1r IR21
      -35 -10
121    ATTTTAAAAAACGAAAAAGCAAAACAATCATGAAAAAGAAAGTATTAAAAATTGTGTT
      RBS hirJM79 M K K K V L K H C V
181    ATTCTAGGAATATTAGGAACCTGTCTAGCTGGCATCGGTACAGGAATAAAAGTTGATGCA
      I L G I L G T C L A G I G T G I K V D A
241    GCTACTTACTATGGAATGCTCTTTATTGTAAACAAAGAAAAATGTTGGGTAGATTGGAAT
      A T Y Y G N G L Y C N K E K C W V D W N
301    CAAGCTAAAGGAGAAATTGCAAAATTTATTGTTAATGGTTGGGTTAATCATGGTCCATGG
      Q A K G E I G K I I V N G W V N H G P W
361    GCACCTAGAAGGTAGTGGTAGGGAGGTTATTATAATGGATTTTACTAAAGAAGAAAACT
      A P R R * RBS hiriJM79 M D F T K E E K L
421    TTAAATGCAATTAGTAAAGTATACAATGAAGCAACTATAGATGACTATCCTGACTTAAA
      L N A I S K V Y N E A T I D D Y P D L K
481    AGAAAGCTCTTTCTTTTCTAAAGAAATCAGTGAGGGAAAAAGTGTGGTGAAAGTTAG
      E K L F L Y S K E I S E G K S V G E V S
541    TATGAAATTAAGTAGTTTCTTGAAGATATATTTAAACATAAAATTGGATTACCTAA
      M K L S S F L G R Y I L K H K F G L P K
601    ATCTTTAATAGAATTACAAGAAATTTAGTAAGGAATCTCAAGTATATAGAGGATGGGC
      S L I E L Q E I V S K E S Q V Y R G W A
661    TTCTATTGTTATTTGGAGTTAATCTTTTGAATAAAATGAAATGGGACTGAAGAATCAA
      S I G I W S * IR31
721    TTCTGATTCATCAGTCCCATAAATTATAGAGCCGAAAAATTATCATATTTATAGATTAT
      IR3r

```

Fig. 2. Nucleotide sequence of a 780-bp fragment containing the structural gene of hiracin JM79 (*hirJM79*) and its putative immunity gene *hiriJM79*. The deduced amino acid sequences are shown below the DNA sequence. Putative ribosome binding sites (RBS) and promoters are underlined. The cleavage site of the bacteriocin is indicated by a vertical arrow.

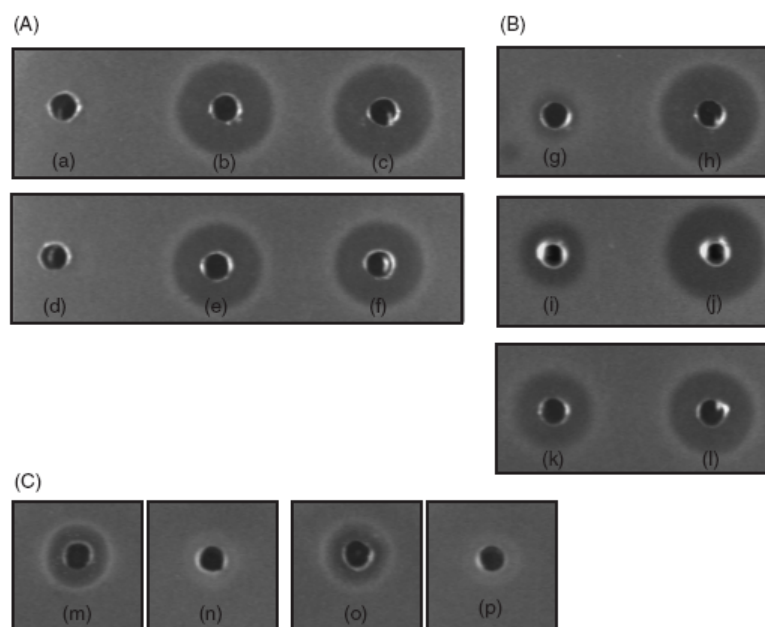


Fig. 3. (A). Antimicrobial activity of supernatants of: (a) *Lactococcus lactis* IL1403 (pMG36c), (b) *Lactococcus lactis* IL1403 (pJPH1), (c) *Lactococcus lactis* IL1403 (pJPH2), (d) *Lactobacillus sakei* LB790 (pMG36c), (e) *Lactobacillus sakei* Lb790 (pJPH1), and (f) *Lactobacillus sakei* Lb790 (pJPH2). (B). Antimicrobial activity of supernatants of: (g) *Enterococcus faecalis* JH2-2 (pMG36c), (h) *E. faecalis* JH2-2 (pJPH2), (i) *Enterococcus faecium* L50/14-2 (pMG36c), (j) *E. faecium* L50/14-2 (pJPH2), (k) *E. faecium* P13, and (l) *Enterococcus hirae* DCH5. The antimicrobial activity of all supernatants was determined by the agar well diffusion test with *E. faecium* T136 as the indicator strain. (C). Antimicrobial activity of a supernatant of *E. hirae* DCH5 as determined by the agar well diffusion test with: (m) *E. faecalis* JH2-2 (pMG36c), (n) *E. faecalis* JH2-2 (pJPH2), (o) *E. faecium* L50/14-2 (pMG36c), and (p) *E. faecium* L50/14-2 (pJPH2) as the indicator strains.

sakei (Hir^R) hosts. The inhibition displayed by *E. faecium* L50/14-2 (pMG36c) is ascribed to its production of enterocin P (Criado *et al.*, 2006), while the small antagonistic effect of the supernatant of *E. faecalis* (pMG36c) would be ascribed to still unknown molecules with antagonistic activity (Fig. 3b). Furthermore, when the *E. faecalis* JH2-2 and the *E. faecium* L50/14-2 derivatives, either carrying pMG36c or pJPH2, were used as indicators of the antimicrobial activity of *E. hirae* DCH5, producer of HirJM79, it was observed that while the *E. faecalis* and the *E. faecium* hosts transformed with pMG36c were sensitive to HirJM79, those transformed with pJPH2 were immune to its activity (Fig. 3c).

Discussion

The analysis of the amino acid sequence of mature HirJM79, deduced from their nucleotide sequence, matches that obtained by Edman degradation except the presence of Thr instead of Gly at position 2, and the presence of Trp, Trp, Gln, Trp, His, and Trp at positions 16, 19, 21, 34, 37 and 40, respectively. Furthermore, such amino acid sequence contained two additional C-terminal amino acids (two Arg residues at positions 43 and 44), as compared with the sequence obtained by Edman degradation. The mature HirJM79 also contains a consensus amino acid sequence at the N-terminal region, which is a common motif among the pediocin-like bacteriocins ('pediocin box', Tyr-Gly-Asn-Gly-Val), except for a Leu residue instead of the Val residue, and it also contains the two conserved cysteine residues always found in the N-terminal part of such bacteriocins. Hiracin JM79 is a cationic peptide with a pI of 9.1. Following the N-terminal methionine, the N-terminal extension of HirJM79 contains three positively charged amino acids (Lys-Lys-Lys), a span of hydrophobic amino acids, and two small and hydrophobic amino acids at positions -1 and -3 relative to the cleavage site (Ala and Val, respectively). This sequence confers a typical signal peptide for proteins processed and secreted by the *sec*-dependent pathway (Von Heijne, 1983; Worobo *et al.*, 1995). Therefore, the bacteriocin produced by *E. hirae* DCH2 is most likely synthesized as a prepeptide that is cleaved through the Val-Asp-Ala residues (positions -3 to -1) releasing the mature HirJM79.

A BLAST protein sequence homology search revealed that HirJM79 was identical to bacteriocin T8 (100% identity; GenBank, accession number DQ402539), produced by *E. faecium* T8 isolated from vaginal secretions of children infected with HIV (De Kwaadsteniet *et al.*, 2006). The mature HirJM79 also reveals a high homology with bacteriocin RC714 (identical to HirJM79 except for the absence of the last two amino acids), produced by *E. faecium* RC714 isolated from a human exudate sample (Del Campo *et al.*, 2001). The mature HirJM79 also reveals homology with the

sec-dependent bacteriocin 31 (69% identity) produced by *E. faecalis* Y1717 (Tomita *et al.*, 1996), and with the *sec*-dependent enterocin P (47% identity) produced by *E. faecium* P13 (Cintas *et al.*, 1997). Homology searches of the deduced HirJM79 peptide, encoded by the second *orf*, denominated *hirJM79*, revealed a 100% identity with the putative immunity protein of bacteriocin T8 (De Kwaadsteniet *et al.*, 2006), and a 50% identity with the putative immunity protein of bacteriocin 31 (Tomita *et al.*, 1996). The timely and independent characterization by unrelated research groups of bacteriocins produced by LAB is unexpected but not infrequent in the bacteriocin research field. Pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici* H (Motlagh *et al.*, 1992), was shown to be identical to pediocin PA-1 produced by *P. acidilactici* PAC1.0 (Marugg *et al.*, 1992), whereas curvacin A produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174 (Tichaczek *et al.*, 1992) is also identical to sakacin A produced by *Lactobacillus sakei* Lb706 (Holck *et al.*, 1992), and these bacteriocins are recognized in scientific literature as pediocin AcH/pediocin PA-1, and curvacin A/sakacin A. Since HirJM79 is produced by a distinct enterococcal species, namely *E. hirae* DCH5, isolated from a very unrelated ecological niche as compared with bacteriocin T8, produced by *E. faecium* T8 (De Kwaadsteniet *et al.*, 2006), these bacteriocins would be recognized as hiracin JM79/bacteriocin T8.

The third *orf*, *orfC*, encodes a putative protein that mostly resembles (97% identity) a mobilization protein from *E. faecium* DO (GenBank, accession number AAA03000087), and the mobilization protein MobC (43% identity) from *E. faecalis* BFE 1071 (Balla *et al.*, 2000; Balla & Dicks, 2005). Sequence features typical of a transfer origin (*oriT*) (Francia *et al.*, 2004; Smith & Thomas, 2004) are found in the region containing the putative promoter of *orfC*, including two inverted repeats and a sequence (GAGCTTGC) with homology to the core sequence of the *cis*-acting *nic* site of the IncP/Mob_p family of Gram-positive plasmids (Smith & Thomas, 2004; Criado *et al.*, 2006). The fourth *orf*, *orfD*, encodes a protein showing a high sequence homology (99% identity) with the relaxase/mobilization nuclease domain described in the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *E. faecium* L50 (Criado *et al.*, 2006), with an analogous domain (93% identity) described in *E. faecium* DO (GenBank, accession number AAK03000087), and with the mobilization protein MobA (44% identity) from *E. faecalis* BFE 1071 (Balla & Dicks, 2005). Typical features for this protein family is the presence of three highly conserved motifs (I, II, and III) at the N-terminal relaxase domain (Francia *et al.*, 2004). Interestingly, the homology of the ORFD encoded by *E. hirae* DCH5 shows a larger homology (93% identity) toward the relaxase/mobilization nuclease domain of *E. faecium* DO, that the 75% identity described for the ORF4 encoded next to bacteriocin T8

(De Kwaadsteniet *et al.*, 2006) for the same nuclease domain of *E. faecium* DO, suggesting that the ORFD protein encoded next to HirJM79 and the ORF4 protein, encoded next to bacteriocin T8, may not be identical.

Our study includes the sequence of 2838 contiguous nucleotides of the hiracin JM79 operon, a putative mobilization protein, a relaxase/mobilization nuclease domain, and an hypothetical protein, although the genes downstream of the structural HirJM79 gene may not be identical to those in the vicinity of bacteriocin T8. Moreover, no resident plasmids were found in *E. hirae* DCH5, suggesting that this gene cluster is integrated in the genome. However, the presence of a mobilization protein, a relaxase and a possible *oriT* sequence in the vicinity of genes coding HirJM79, and its putative immunity protein (HirJM79) suggests that further efforts may be performed toward elucidation of the complete genetic structure of the DNA fragment coding these and, maybe, other related functions, which may contribute to their transfer and mobilization among enterococci. Little is known about the evolutionary relationships among bacteriocins from different bacteria, but conservation of bacteriocin gene clusters suggest that production of bacteriocins confers selective advantages to the producer strain. Further efforts would be performed toward elucidation of the mechanisms of transfer and mobilization of bacteriocin gene clusters among LAB, including those relative to hiracin JM79, bacteriocin T8 (De Kwaadsteniet *et al.*, 2006), and bacteriocin RC714 (Del Campo *et al.*, 2001) encoded by distinct enterococci from different ecological niches.

All recombinant *Lactococcus lactis* IL1403 and *Lactobacillus sakei* Lb790 strains, resistant to HirJM79 (Hir^R) and carrying either pJPH1 (*hirJM79*) or pJPH2 (*hirJM79*+*hirJM79*), displayed extracellular antagonistic activity, suggesting that *hirJM79* is the minimum requirement for production of biologically active HirJM79 even in the absence of the putative immunity peptide HirJM79. When HirJM79 produced by *Lactococcus lactis* IL1403 (pJPH1) was purified to homogeneity, a peptide fragment of the molecular mass of HirJM79, as produced by *E. hirae* DCH5, was obtained (results not shown). However, the failure to obtain transformants from the *E. faecalis* JH2-2 and *E. faecium* L50/14-2 strains, sensitive to HirJM79 (Hir^S), and transformed with pJPH1 and the observation that the same strains transformed with pJPH2 showed extracellular antagonistic activity and are immune to the antagonistic effect of HirJM79, suggest that HirJM79 is the immunity protein for HirJM79. The results obtained also suggest that HirJM79 is efficiently processed in recombinant *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, *E. faecalis*, and *E. faecium* cells, and that the bacteriocin is most likely externalized by the general secretory pathway or *sec*-dependent pathway of the host cells. Previously described *sec*-dependent bacteriocins

produced by LAB includes acidocin B, divergicin A, bacteriocin 31, enterocin P, lactococcin 972, propionin T1, and enterolysin A (Gutiérrez *et al.*, 2006).

As shown in this study, *E. hirae* DCH5, a bacteriocin producing *Enterococcus* isolated from Mallard ducks (*A. platyrhynchos*), produces a highly active, *sec*-dependent antimicrobial peptide hiracin JM79/bacteriocin T8. The increase in the antimicrobial activity of HirJM79, during its purification, may be the result of removal of antimicrobial inhibitors, disaggregation of the bacteriocin or conformational change to a more active form of the bacteriocin in the hydrophobic solvent (Gutiérrez *et al.*, 2004). However, the potential use of enterococci as producers of bacteriocins must be cautioned as many *Enterococcus* isolates code for potential virulence factors (Eaton & Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001; Martín *et al.*, 2006), and are involved in human infections and antibiotic resistance (Pillar & Gillmore, 2004; Martín *et al.*, 2006). Nevertheless, *E. hirae* DCH5 and its bacteriocin, hiracin JM79/bacteriocin T8, might have biotechnological interest as natural antimicrobial agents in medical applications and/or in the food and feed industry. However, before an evaluation of their potential applications, other safety and/or technological characteristics of this strain, and its bacteriocin, would be investigated.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr K. Sletten (Department of Biochemistry, University of Oslo, Norway) for help in the amino acid sequencing of hiracin JM79, to Dr Rosa del Campo (Departamento de Microbiología, Hospital Universitario 'Ramón y Cajal', Madrid, Spain) for supply of strain JH2-2, and to Prof. Jan Kok (Department of Genetics, University of Groningen, the Netherlands) for supply of pMG36c. This work was partially supported by grants AGL2003-01508 and AGL2006-01042 from the Ministerio de Educación y Cultura (MEC), and by grant S-0505/AGR/0265 from the Comunidad de Madrid, Spain. J. Sánchez holds a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD), Spain.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
- Aukrust TW, Brurberg MB & Nes IF (1995) Transformation of lactobacilli by electroporation. *Methods Mol Biol* 47: 201–208.
- Balla E & Dicks LMT (2005) Molecular analysis of the gene cluster involved in the production and secretion of enterocins 1071A and 1071B and of the genes responsible for the

- replication and transfer of plasmid pEF1071. *Int J Food Microbiol* 99: 33–45.
- Balla EL, Dicks MT, Du Toit M, Van der Merwe MJ & Holzapfel WH (2000) Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl Environ Microbiol* 66: 1298–1304.
- Casaus P, Nilsen T, Cintas LM, Nes IF, Hernández PE & Holo H (1997) Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287–2294.
- Chopin MC, Chopin A, Moillo-Bott A & Langella P (1984) Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* 11: 260–263.
- Cintas LM, Casaus P, Håvarstein LS, Hernández PE & Nes IF (1997) Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol* 63: 4321–4330.
- Cintas LM, Casaus P, Herranz C, Håvarstein LS, Holo H, Hernández PE & Nes IF (2000) Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J Bacteriol* 182: 6806–6814.
- Cintas LM, Casaus P, Herranz C, Nes IF & Hernández PE (2001) Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci Technol Int* 7: 281–305.
- Cotter PD, Hill C & Ross RP (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev Microbiol* 3: 777–788.
- Criado R, Diep DB, Aakra Å, Gutiérrez J, Nes IF, Hernández PE & Cintas LM (2006) The complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl Environ Microbiol* 72: 6653–6666.
- De Kwaadsteniet M, Fraser T, Van Reenen CA & Dicks LMT (2006) Bacteriocin T8, a novel Class IIa *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Appl Environ Microbiol* 72: 4761–4766.
- Del Campo R, Tenorio C, Jiménez R, Rubio C, Gómez-Lus R, Baquero F & Torres C (2001) Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 905–912.
- Eaton TJ & Gasson MJ (2001) Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 67: 1628–1635.
- Eijsink VGH, Axelsson L, Diep DB, Håvarstein LS, Holo H & Nes IF (2002) Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria: an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 639–654.
- Fimland G, Johnsen L, Dalhus B & Nissen-Meyer J (2005) Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J Pept Sci* 11: 688–696.
- Foulquié-Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E & De Vuyst L (2005) The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 106: 1–24.
- Francia MV, Varsaki A, Garcillán-Barcia MP, Latorre A, Drinas C & de la Cruz F (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* 28: 79–100.
- Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, Vancanney M, Swings J & Holzapfel WH (2001) Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 67: 4385–4389.
- Gutiérrez J, Criado R, Citti R, Martín M, Herranz C, Fernández MF, Cintas LM & Hernández PE (2004) Performance and applications of polyclonal antipeptide antibodies specific for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *J Agric Food Chem* 52: 2247–2255.
- Gutiérrez J, Larsen R, Cintas LM, Kok J & Hernández PE (2006) High-level heterologous production and functional expression of the *sec*-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 41–51.
- Håvarstein LS, Diep DB & Nes IF (1995) A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol* 16: 229–240.
- Herranz C & Driessen AJM (2005) *Sec*-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 71: 1959–1963.
- Holck A, Axelsson L, Birkeland SE, Aukrust T & Blom H (1992) Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J Gen Microbiol* 138: 2715–2720.
- Holo H & Nes IF (1989) High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl Environ Microbiol* 55: 3119–3123.
- Jacob AE & Hobbs SJ (1974) Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J Bacteriol* 117: 360–372.
- Martín M, Gutiérrez J, Criado R, Herranz C, Cintas LM & Hernández PE (2006) Genes encoding bacteriocins and their expression, and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J Food Prot* 69: 520–531.
- Marugg JD, González CE, Kunka BS, Ledebøer AM, Pucci MJ, Toonen MY, Walker SA, Zoetmulder LCM & Vanderbergh P (1992) Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl Environ Microbiol* 58: 2360–2367.
- Motlagh AM, Bhunia AK, Szostek F, Hansen TR, Johnson MC & Ray B (1992) Nucleotide and amino acid sequence of *pap*-gene (pediocin ACh production) in *Pediococcus acidilactici* H. *Lett Appl Microbiol* 15: 45–48.

- Nes IF, Diep DB, Håvarstein LS, Bruberg MB, Eijsink V & Holo H (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek* **70**: 113–128.
- Pillar CM & Gillmore MS (2004) Enterococcal virulence-pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. *Front Biosci* **9**: 2335–2346.
- Schillinger U & Lucke FK (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* **55**: 1901–1906.
- Smith MCA & Thomas CD (2004) An accessory protein is required for relaxosome formation by small staphylococcal plasmids. *J Bacteriol* **186**: 3363–3373.
- Tichaczek PS, Nissen-Meyer J, Nes IF, Vogel RF & Hammes WP (1992) Characterization of the bacteriocins curvacin A and sakacin P produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and *Lactobacillus sake* LTH673. *Syst Appl Microbiol* **15**: 460–468.
- Tomita H, Fujimoto S, Tanimoto K & Ike Y (1996) Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J Bacteriol* **178**: 3585–3593.
- Van de Guchte M, van der Vossen JMBM, Kok J & Venema G (1989) Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* **55**: 224–228.
- Van Wely KHM, Swaving J, Freudl R & Driessen AJM (2001) Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 437–454.
- Von Heijne G (1983) Patterns of amino acids near signal sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* **133**: 17–21.
- Worobo RW, van Belkum MJ, Sailer M, Roy KL, Vederas JC & Stiles ME (1995) A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J Bacteriol* **177**: 3143–3149.

CAPÍTULO V
CLONACIÓN Y PRODUCCIÓN
HETERÓLOGA DE LA HIRACINA
JM79, UNA BACTERIOCINA SEC-
DEPENDIENTE PRODUCIDA POR
Enterococcus hirae DCH5, EN OTRAS
BACTERIAS LÁCTICAS Y *Pichia*
pastoris

CHAPTER V
CLONING AND HETEROLOGOUS
PRODUCTION OF HIRACIN JM79, A
SEC-DEPENDENT BACTERIOCIN
PRODUCED BY *Enterococcus hirae*
DCH5, IN LACTIC ACID BACTERIA
AND *Pichia pastoris*

Artículo publicado en el Applied and Environmental Microbiology

Cloning and Heterologous Production of Hiracin JM79, a Sec-Dependent Bacteriocin Produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in Lactic Acid Bacteria and *Pichia pastoris*[∇]

Jorge Sánchez, Juan Borrero, Beatriz Gómez-Sala, Antonio Basanta, Carmen Herranz, Luis M. Cintas, and Pablo E. Hernández*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Received 13 November 2007/Accepted 20 February 2008

Hiracin JM79 (HirJM79), a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, was cloned and produced in *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Pichia pastoris*. For heterologous production of HirJM79 in lactic acid bacteria (LAB), the HirJM79 structural gene (*hirJM79*), with or without the HirJM79 immunity gene (*hiriJM79*), was cloned into the plasmid pMG36c under the control of the constitutive promoter P₃₂ and into the plasmid pNZ8048 under the control of the inducible P_{NisA} promoter. For the production of HirJM79 in *P. pastoris*, the gene encoding the mature HirJM79 protein was cloned into the pPICZαA expression vector. The recombinant plasmids permitted the production of biologically active HirJM79 in the supernatants of *L. lactis* IL1403, *L. lactis* NZ9000, *L. sakei* Lb790, *E. faecalis* JH2-2, and *P. pastoris* X-33, the coproduction of HirJM79 and nisin A in *L. lactis* DPC5598, and the coproduction of HirJM79 and enterocin P in *E. faecium* L50/14-2. All recombinant LAB produced larger quantities of HirJM79 than *E. hirae* DCH5, although the antimicrobial activities of most transformants were lower than that predicted from their production of HirJM79. The synthesis, processing, and secretion of HirJM79 proceed efficiently in recombinant LAB strains and *P. pastoris*.

Bacteriocins are ribosomally synthesized peptides or proteins with antimicrobial activity, and considerable research interest has focused on the bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) because of their potential applications in food, pharmaceuticals, nutraceuticals, and veterinary and human medicine (10, 19, 24, 50). Among the LAB, the enterococci produce a diverse and heterogeneous group of bacteriocins, coined enterocins, which differ with respect to their antimicrobial activities, structures, processing, and secretion mechanisms (8, 16, 40). However, since enterococci are involved in food spoilage, nosocomial infections, and the spread of antibiotic resistance (36, 41), interest in the heterologous production and functional expression of enterocins in other microbial hosts is growing rapidly. Moreover, the production of enterocins in other hosts could lead to increased bacteriocin production, production of bacteriocins in safer hosts, obtention of multibacteriocinogenic strains with wider antimicrobial spectra, and the transfer of antimicrobial capabilities to LAB that are useful as starter, protective, and probiotic cultures in food (23).

Most bacteriocins from LAB are synthesized as biologically inactive precursors or prepeptides containing an N-terminal extension. The mature peptides are generally classified as lanthionine-containing lantibiotics (class I) and non-lanthionine-containing bacteriocins (class II) (10). However, a new classi-

fication scheme groups the enterococcal bacteriocins into class I (lantibiotic), class II (non-lantibiotic), class III (cyclic), and class IV (large proteins). Class II comprises the class II.1 (pediocin-like), the class II.2 (leaderless), and the class II.3 (non-pediocin-like) enterocins (16). The N-terminal extensions of most bacteriocins are of the so-called double-glycine type (leader sequence) and are cleaved off concomitantly with their export across the cytoplasmic membrane by dedicated ATP-binding cassette transporters and their accessory proteins (25). However, some class II bacteriocins contain N-terminal extensions of the so-called Sec type (signal peptide), which functions as a targeting and recognition signal and which is proteolytically cleaved concomitantly with bacteriocin externalization by the Sec pathway (5, 22, 26, 49). This pathway is a universally conserved protein translocation system that translocates unfolded proteins across the cell membrane via a protein-conducting pore formed by the SecYEG complex and a molecular motor, the ATPase SecA (35). Enterocins such as enterocin L50 (L50A and L50B), enterocin Q, and enterocin EJ97 are synthesized without N-terminal leader sequences and may represent a new class of bacteriocins with a novel secretion mechanism (7, 16, 40).

Hiracin JM79 (HirJM79) is a Sec-dependent class II bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5 isolated from wild mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). The HirJM79 structural gene (*hirJM79*) encodes a 74-amino-acid prepeptide containing a 30-amino-acid signal peptide (SP_{HirJM79}) and a 44-amino-acid mature bacteriocin (42). The broad antimicrobial activity of HirJM79 against food-borne pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes* has attracted interest for its production by heterologous hosts. This study reports the cloning, production, and secretion of HirJM79, using different ex-

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34-91-3943752. Fax: 34-91-3943743. E-mail: ehernan@vet.ucm.es.

[∇] Published ahead of print on 29 February 2008.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description ^a	Source and/or reference ^b
Strains		
<i>Enterococcus hirae</i> DCH5	Hiracin JM79 producer	DNBTA; 41
<i>Enterococcus faecium</i> T136	Enterocin A and B producer; HirJM79 ^s , NisA ^s , EntP ^s ; used as an indicator strain	DNBTA; 3
P13	Enterocin P producer	DNBTA; 5
L50/14-2	<i>E. faecium</i> L50 cured derivative (lacking pCIZ1 and pCIZ2); EntP producer; HirJM79 ^s	DNBTA; 11
<i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2	Plasmid-free strain, non-bacteriocin producer; HirJM79 ^s	30
<i>Lactobacillus sakei</i> Lb790	Plasmid-free strain, non-bacteriocin producer; HirJM79 ^s	43
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	Plasmid-free derivative of IL594; HirJM79 ^s	4
DPC5598	Plasmid-free derivative of DPC4268; NisA producer; HirJM79 ^s	DPC; 46
BB24	NisA producer; HirJM79 ^s	DNBTA; 6
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000	MG1363 <i>pepN::nisRK</i> ; HirJM79 ^s	NIZO; 34
MG1363	Plasmid-free derivative of NCDO712; NisA ^s ; HirJM79 ^s ; used as an indicator strain	IFR; 18
<i>Pichia pastoris</i> X-33	Yeast wild type	Invitrogen Life Technologies
Plasmids		
pMG36c	Cm ^r ; pMG36c derivative	RUG-MG; 47
pJPH1	Cm ^r ; pMG36c derivative carrying the PCR product HE (P ₃₂ ribosomal binding site and the <i>hirJM79</i> gene) under the control of P ₃₂	DNBTA; 42
pJPH2	Cm ^r ; pMG36c derivative carrying the PCR product HEi (P ₃₂ ribosomal binding site and the <i>hirJM79</i> and <i>hirJM79</i> genes) under the control of P ₃₂	DNBTA; 42
pNZ8048	Cm ^r ; inducible expression vector carrying the <i>nisA</i> promoter	34
pNZH3	Cm ^r ; pNZ8048 derivative carrying the PCR product indHE (<i>hirJM79</i>) under the control of P _{NisA}	This work
pNZH4	Cm ^r ; pNZ8048 derivative carrying the PCR product indHEi (<i>hirJM79</i> and <i>hirJM79</i>) under the control of P _{NisA}	This work
pPICZαA	Zeo ^r ; integrative plasmid carrying the secretion signal sequence from the <i>S. cerevisiae</i> α factor prepropeptide and functional sites for the integration at the 5' AOX1 locus of <i>P. pastoris</i> X-33	Invitrogen Life Technologies
pPICH5	Zeo ^r ; pPICZαA derivative carrying the PCR product PH5	This work

^a Em, erythromycin; Cm, chloramphenicol; Zeo, zeocin.

^b DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain); DPC, Teagasc Dairy Products Research Centre, Moorepark, Fermoy (County Cork, Ireland); NIZO, Department of Biophysical Chemistry, NIZO food research (Ede, The Netherlands); IFR, Institute of Food Research (Norwich, United Kingdom); RUG-MG, Department of Molecular Genetics, University of Groningen (Haren, The Netherlands).

pression vectors and strains of LAB and *Pichia pastoris* as the production hosts.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, growth conditions, and antimicrobial activity assays. The LAB strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *E. hirae* DCH5, the HirJM79 producer, was isolated from the intestinal content of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) (41). Enterococci were grown in MRS broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) at 32°C. Lactococcal strains and *Lactobacillus sakei* Lb790 were propagated at 32°C in M17 broth (Oxoid) supplemented with 0.5% (wt/vol) glucose (GM17). For cell dry weight determinations, 10-ml samples of culture were centrifuged at 12,000 × *g* at 4°C for 10 min, the supernatant was discarded, and the pellet was washed and resuspended in 1 ml of distilled water with 0.85% NaCl (wt/vol). The samples were filtered under vacuum conditions through a preweighed 0.20-μm-pore-size filter (Whatman Ltd., Maidstone, United Kingdom), dried in an oven at 100°C until weight was constant, and accurately weighed. A correlation between cell dry weight and optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was determined and used to calculate biomass concentrations. Transformants of *Lactobacillus lactis*, *L. sakei* Lb790, *Enterococcus faecalis* JH2-2, and *E. faecium* L50/14-2 were selected with 5 μg/ml of chloramphenicol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). An EasySelect *Pichia* expression kit, the expression vector pPICZαA, the wild-type *P. pastoris* X-33 host, and zeocin were obtained from Invitrogen Life Technologies (Madrid, Spain). *Escherichia coli* JM109 competent cells (Promega, Madison, WI) were

propagated in Luria-Bertani (LB) broth (Sigma) at 37°C, while *P. pastoris* X-33 was grown in a yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium (Invitrogen) at 30°C. *E. coli* JM109 derivatives carrying pPICZαA were selected on LB plates with zeocin (25 μg/ml). The *P. pastoris* X-33-transformed cells were selected on YPD plates with zeocin (100 μg/ml) and sorbitol (1 M) at 30°C for 3 to 10 days. The *P. pastoris* X-33TH clone was grown in buffered methanol minimal (BMM) medium (1.34% yeast nitrogen base [YNB], 4 × 10⁻⁵% biotin, 100 mM potassium phosphate [pH 6], 0.5% methanol), and BMMY (BMM with 1% yeast extract and 2% peptone) at 30°C to induce the production of HirJM79. Cell-free culture supernatants were obtained by centrifugation of the grown cultures at 12,000 × *g* at 4°C for 10 min, adjusted to pH 6.2 with 1 M NaOH, filtered through 0.20-μm-pore-size filters (Whatman), and stored at -20°C until use. The antagonistic activity of individual colonies was screened by the stab-on-agar test, while the antimicrobial activity of cell-free culture supernatants was screened by the agar diffusion test (ADT) and, when stated, by the microtiter plate assay (MPA) (7). With the MPA, the growth inhibition of the sensitive culture was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtiter Labsystems iEMS plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). One bacteriocin unit was defined as the reciprocal of the highest dilution of the bacteriocin that caused 50% growth inhibition (50% of the control culture without bacteriocin). Recombinant cultures of *L. lactis* NZ9000 were induced for the production of HirJM79 when they had reached an OD₆₀₀ of 0.5, using a 4 × 10³-fold-diluted supernatant of *L. lactis* BB24 (the nisin A [NisA] producer) at a final concentration of 10 ng/ml.

TABLE 2. Primers and PCR products used in this study

Primer or PCR product	Nucleotide sequence (5'–3') or description ^a	Purpose
Primers		
HirA-F	TGAATTCAAACTACTTTTATGACG	Amplification of Thi
HirA-R	TGGGACTGATGAATCAGAATTG	Amplification of Thi
HNZ-F	AAACTCATCATGAAAAAGAAAGTATTAACATTGTGTTATTCTAGG	Amplification of indHE and indHEi
HPJE-R	ATAAGTTAAGCTTGTACTACCTTCTAGGTGCCCATGGACC	Amplification of indHE
HPJEI-R	ATAAGTTAAGCTTGTATTAACCTCAAATACCAATAGCAGCCCATC	Amplification of indHEi
NZPJ-F	TGTCGATAACGCGAGCATAA	Amplification of inserts from pNZ8048
NZPJ-R	CAAAGCAACACGTGCTGTAA	Amplification of inserts from pNZ8048
PJHA-F	AATTATACTCGAGAAAAGAGCTACTTACTATGGAAATGGTCTTTATTGTAAC	Amplification of PH1 fragment
PJHA-R	ATAAGTTCTAGAAATACTACCTTCTAGGTGCCCATGGACC	Amplification of PH1 fragment
5' α factor	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	Amplification of inserts from pPICZ α A
3' AOX1 locus	GCAATGGCATTCTGACATCC	Amplification of inserts from pPICZ α A
PCR products		
Thi	711-bp fragment containing the <i>hirJM79</i> and <i>hiriJM79</i> genes	Template DNA
HE	270-bp SacI-HindIII fragment containing the P ₃₂ ribosome binding site and the <i>hirJM79</i> gene	Cloning in pMG36c
HEi	577-bp SacI-HindIII fragment containing the P ₃₂ ribosome binding site and the <i>hirJM79</i> and <i>hiriJM79</i> genes	Cloning in pMG36c
indHE	250-bp BspHI-HindIII fragment containing the <i>hirJM79</i> gene	Cloning in pNZ8048
indHEi	503-bp BspHI-HindIII fragment containing the <i>hirJM79</i> and <i>hiriJM79</i> genes	Cloning in pNZ8048
PH5	170-bp XhoI-XbaI fragment carrying the α factor Kex2 signal cleavage fused to the mature HirJM79	Cloning in pPICZ α A

^a Cleavage sites for restriction enzymes are underlined in the primers.

Basic genetic techniques and enzymes. Total genomic DNA from *E. hirae* DCH5 was isolated by using a Wizard DNA purification kit (Promega, Madison, WI). Plasmid DNA isolation was performed with a QIAprep Spin miniprep kit (Qiagen, Hilden, Germany) or a High Pure plasmid isolation kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), as described by the manufacturer, with the addition of lysozyme (40 mg/ml) and mutanolysin (500 U/ml). All DNA restriction enzymes were from New England BioLabs (Beverly, MA) or Roche Molecular Biochemicals and were used as recommended by the supplier. Ligations were performed with T4 DNA ligase (Roche). Ligation mixtures were used to transform electrocompetent cells of *Lactobacillus lactis*, *L. sakei* Lb790, *E. faecium* L50/14-2, and *E. faecalis* JH2-2 with a Gene Pulser and a pulse controller apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), as described previously (1, 27). Competent *P. pastoris* X-33 cells were obtained as recommended (Invitrogen), and electroporation of competent cells was performed as described previously (21). The proper clones were checked by a bacteriocinogenicity test and by PCR and sequencing of the inserts.

PCR amplification and nucleotide sequencing. Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, United Kingdom). PCR amplifications of inserts were performed in 50- μ l reaction mixtures containing 1 to 3 μ l of purified DNA, 70 pmol of each primer, and 1 U of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Madrid, Spain). Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (97°C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 45 s), annealing (50 to 62°C for 30 s), and elongation (72°C for 15 s to 3 min), and a final extension step at 72°C for 7 min in a DNA thermal cycler (Techgene; Techne, Cambridge, United Kingdom). The resulting PCR fragments were analyzed by electrophoresis in 2% agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels, with a Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad). The PCR-generated fragments were purified by a QIAquick PCR purification kit (Qiagen) or a QIAquick gel extraction kit (Qiagen) before they were cloned into the vectors and used for nucleotide sequencing. Nucleotide sequencing of purified PCR products was done with an ABI PRISM BigDye Terminator cycle sequence reaction kit and an ABI PRISM model 377 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) at a DNA sequencing service (Sistemas Genómicos, Valencia, Spain).

Recombinant plasmids for heterologous production of HirJM79 in LAB. In a previous work, derivatives of plasmids pMG36c, pJPH1 (*hirJM79*), and pJPH2 (*hirJM79* plus *hiriJM79*) carrying the structural gene and the structural-plus-

immunity gene, respectively, of the *HirJM79* produced by *E. hirae* DCH5 were constructed for the constitutive production of *HirJM79* in *L. lactis* (42). The control and recombinant plasmids were reisolated from *Lactococcus lactis* IL403 and then transferred to *Lactobacillus sakei* Lb790, *E. faecium* L50/14-2, and *E. faecalis* JH2-2 by electroporation. The plasmid pNZ8048, containing the inducible P_{N_{tr}A} promoter, was also used for cloning the *hirJM79* structural gene, with or without its putative *hiriJM79* immunity gene. The primers and inserts used for the construction of the pNZ8048-derived plasmids are listed in Table 2. The primers HN-Z-F and HPJE-R were used for PCR amplification, from fragment Thi (a 711-bp fragment containing the *hirJM79* and *hiriJM79* genes), of a 250-bp BspHI-HindIII fragment (insert indHE) containing the *hirJM79* gene. The primers HN-Z-F and HPJEI-R were used for PCR amplification, from the same DNA target, of a 503-bp BspHI-HindIII fragment (insert indHEi) containing the *hirJM79* and *hiriJM79* genes. The fragments indHE and indHEi were digested with the indicated restriction enzymes and inserted into pNZ8048 cut with the enzymes NcoI-HindIII. The ligation mixtures were used to transform competent *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 cells. The proper clones, containing pNZH3 (*hirJM79*) or pNZH4 (*hirJM79* plus *hiriJM79*), were checked with a bacteriocinogenicity test and with PCR and sequencing of the inserts.

Heterologous production of HirJM79 in *P. pastoris*. The expression vector used in this work was the plasmid pPICZ α A. The primers and inserts used for the construction of the recombinant plasmids are listed in Table 2. The primers PJHA-F and PJHA-R were used for PCR amplification from the fragment Thi of a 170-bp XhoI-XbaI fragment (insert PH5) carrying the α factor secretion signal peptide without the Glu-Ala spacer adjacent to the Kex2 protease cleavage site, fused to mature *HirJM79* (*hirJM79* without its signal peptide). The fragment PH5 was digested with the above-mentioned restriction enzymes, and the resulting 154-bp XhoI-XbaI-cleaved fragment was ligated into the pPICZ α A plasmid, digested with the same enzymes, to generate plasmid pPICH5. Competent *E. coli* JM109 cells were transformed with pPICH5, and the resulting transformants were confirmed by PCR amplification and sequencing. Purified pPICH5 was linearized with SacI and used to transform competent *P. pastoris* X-33 cells, in which the presence of the integrated pPICH5 genes was confirmed by a bacteriocinogenic test and by PCR and sequencing of the inserts.

Production of specific anti-HirJM79 polyclonal antibodies and ELISA. The peptide fragment HJP3 (NH₂-CNHGPWAPRR-COOH), derived from the C-terminal amino acid sequence of *HirJM79*, was selected as the antigen for the

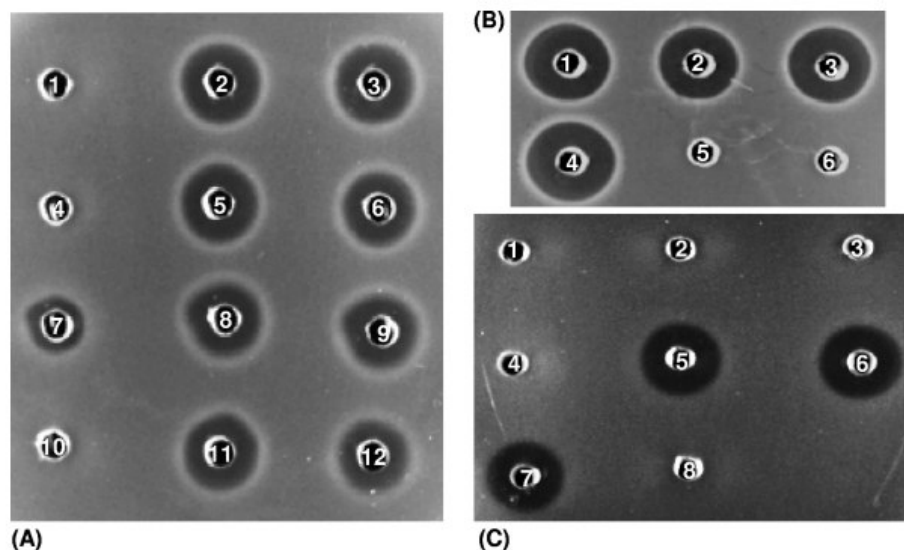


FIG. 1. Antimicrobial activity of LAB cultures as determined by the ADT. (A) Supernatants of 1, *L. lactis* IL1403(pMG36c); 2, *L. lactis* IL1403(pJPH1); 3, *L. lactis* IL1403(pJPH2); 4, *L. lactis* NZ9000(pMG36c); 5, *L. lactis* NZ9000(pJPH1); 6, *L. lactis* NZ9000(pJPH2); 7, *L. lactis* DPC5598(pMG36c); 8, *L. lactis* DPC5598(pJPH1); 9, *L. lactis* DPC5598(pJPH2); 10, *E. faecium* T136; 11, *E. hirae* DCH5; 12, *E. faecium* P13, using *E. faecium* T136 as the indicator strain. (B) Supernatants of 1, *L. lactis* DPC5598(pMG36c); 2, *L. lactis* DPC5598(pJPH1); 3, *L. lactis* DPC5598(pJPH2); 4, *L. lactis* BB24; 5, *E. hirae* DCH5; 6, *E. faecium* P13, using *L. lactis* MG1363 as the indicator strain. (C) Supernatants of 1, *L. lactis* NZ9000(pNZ8048) before induction; 2, *L. lactis* NZ9000(pNZH3) before induction; 3, *L. lactis* NZ9000(pNZH4) before induction; 4, *L. lactis* NZ9000(pNZ8048) after induction; 5, *L. lactis* NZ9000(pNZH3) after induction; 6, *L. lactis* NZ9000(pNZH4) after induction; 7, *E. hirae* DCH5; 8, *E. faecium* T136, using *E. faecium* T136 as the indicator strain.

generation of antibodies of predetermined specificity against HirJM79. The synthetic peptide HJP3 was synthesized by Invitrogen Ltd. (Paisley, Scotland, United Kingdom), with a peptide purity of >95%. The peptide HJP3 was conjugated to the keyhole limpet hemocyanin (KLH) carrier protein as an HJP3-KLH conjugate, 1:2 (wt/wt), using the components of an Imject maleimide-activated mariculture KLH kit (Perbio Science, Rockford, IL) as the immunogen. Rabbits (New Zealand White females) were immunized with HJP3-KLH, as described previously (20). Serum was obtained from blood samples incubated overnight at 4°C, centrifuged at $1,000 \times g$ at room temperature for 15 min, and stored at -20°C until use. The enzyme-linked immunoassay (ELISA) procedures for antiserum titration and the determination of antiserum specificity and sensitivity were performed as described previously (20, 39). A noncompetitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA) was developed to detect and quantify HirJM79 in the supernatants of producer strains. Briefly, wells of flat-bottomed polystyrene microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight (4°C) with different concentrations of pure HirJM79 or with supernatants from *E. hirae* DCH5 or the recombinant LAB and the *P. pastoris* hosts. After the anti-HJP3-KLH serum and the goat anti-rabbit immunoglobulin G peroxidase conjugate (Cappel Laboratories, West Chester, PA) were added, bound peroxidase was determined with 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS; Sigma) as the substrate by measuring the absorbance of the wells at 405 nm with a Labsystems iEMS reader (Labsystems).

Purification of HirJM79 and mass spectrometry analysis. The HirJM79 produced by *P. pastoris* X-33TH was purified as previously described (21). Briefly, supernatants from 400-ml cultures grown in BMMY medium were subjected to precipitation with ammonium sulfate, applied to gel filtration PD-10 columns, and further subjected to cation exchange (SP Sepharose Fast Flow) and hydrophobic interaction (Octyl Sepharose CL-4B) chromatography, followed by a reverse-phase chromatography step in a C_{18} -to- C_{18} column (PeRPC HR 5/5) integrated in a reverse-phase fast-performance liquid chromatography (RP-FPLC) system. All chromatographic columns and supporting gels were from Amersham Biosciences Europe GmbH (Cerdanyola, Spain). Purified fractions from the last RP-FPLC step were subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, as described previously (23).

RESULTS

Cloning and production of HirJM79 in heterologous LAB. When derivatives of the plasmids pMG36c, pJPH1 (*hirJM79*), and pJPH2 (*hirJM79* plus *hiriJM79*) were used to transform the nonbacteriocinogenic hosts *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 and *Lactobacillus sakei* Lb790, resistant to HirJM79 (*Hir*^r), the supernatants of the recombinant strains showed antagonistic activity against the indicator strain *E. faecium* T136. When the plasmid pJPH2 was used to transform *E. faecalis* JH2-2 and *E. faecium* L50/14-2, sensitive to HirJM79 (*Hir*^s), the strains produced halos of inhibition due to HirJM79 that were similar to or even greater than those produced by the *Hir*^r recombinants (results not shown). Similarly, when the pJPH1 and pJPH2 plasmids were transferred to *L. lactis* subsp. *lactis* DPC5598 and *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (*Hir*^r), all recombinant derivatives were active against *E. faecium* T136 (*Hir*^s and *NisA*^s) (Fig. 1A), while the *L. lactis* DPC5598 derivatives also showed antagonistic activity against *L. lactis* MG1363 (*Hir*^r and *NisA*^s) as the indicator strain (Fig. 1B). When derivatives of the plasmids pNZ8048, pNZH3 (*hirJM79*), and pNZH4 (*hirJM79* plus *hiriJM79*) were transferred to *L. lactis* NZ9000, all recombinant cultures containing either pNZH3 or pNZH4 displayed antimicrobial activity against *E. faecium* T136 after induction with *NisA* (Fig. 1C).

The heterologous extracellular production of HirJM79 by all recombinant strains was further quantified by specific anti-HirJM79 antibodies with an NCI-ELISA (Table 3). All *L. lactis* strains produced larger quantities of HirJM79 than *E. hirae* DCH5. The production of HirJM79 by derivatives of *L. lactis*

TABLE 3. Bacteriocin production and antimicrobial activity of supernatants from recombinant strains

Strain	Bacteriocin production ($\mu\text{g}/\text{mg}$ cell dry wt) ^a			Antimicrobial activity (BU/mg cell dry wt) ^b		Specific antimicrobial activity (10^3 BU/ μg HirJM79) ^c
	HirJM79	NisA	EntP	<i>Enterococcus faecium</i> T136	<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>						
IL1403(pMG36c)	NP			NA		NE
IL1403(pJPH1)	7.28			13,050		1.79
IL1403(pJPH2)	10.29			22,537		2.19
DPC5598(pMG36c)	NP	1,436		77	5,477	NE
DPC5598(pJPH1)	5.48	995		7,213	3,796	1.31
DPC5598(pJPH2)	7.36	1,082		12,287	4,128	1.66
BB24 ^d	NP	2,400		89	9,152	NE
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>						
NZ9000(pMG36c)	NP			NA		NE
NZ9000(pJPH1)	3.97			5,820		1.46
NZ9000(pJPH2)	5.15			5,743		1.11
NZ9000(pNZ8048)	NP			NA		NE
NZ9000(pNZH3)	6.36			9,882		1.44
NZ9000(pNZH4)	11.24			26,480		2.35
<i>Lactobacillus sakei</i>						
Lb790(pMG36c)	NP			NA		NE
Lb790(pJPH1)	6.75			1,993		0.29
Lb790(pJPH2)	3.63			2,388		0.65
<i>Enterococcus faecium</i>						
L50/14-2(pMG36c)			3.78	472		NE
L50/14-2(pJPH2)	1.74		3.14	12,720		7.31
<i>Enterococcus faecalis</i>						
JH2-2(pMG36c)			NP	NA		NE
JH2-2(pJPH2)	1.63		NP	16,162		9.90
<i>Enterococcus faecium</i> P13 ^d						
			6.20	702		NE
<i>Enterococcus hirae</i> DCH5 ^d						
	1.31			6,827		5.21

^a HirJM79 and EntP production were calculated by using an NCI-ELISA with polyclonal antibodies specific for HirJM79 and EntP. Production of NisA in *L. lactis* DPC5598 was estimated according to its antimicrobial activity and related to the production of NisA and the antimicrobial activity of *L. lactis* BB24 (45). NP, no production.

^b Antimicrobial activity was calculated by MPA against *E. faecium* T136 (HirJM79⁺, NisA⁺) and *L. lactis* MG1363 (NisA⁺, HirJM79⁺). NA, no activity.

^c Specific antimicrobial activity refers to the antimicrobial activity against *E. faecium* T136 divided by the HirJM79 produced. BU, bacteriocin unit. NE, not evaluable.

^d Cultures of *L. lactis* BB24, *E. hirae* DCH5, and *E. faecium* P13 were used as controls for NisA, HirJM79, and EntP production, respectively.

IL1403, carrying plasmids pJPH1 and pJPH2, was 5.5- to 7.8-fold higher, respectively, while the production of HirJM79 by derivatives of *L. lactis* NZ9000, transformed with the same plasmids, was 3.0- to 3.9-fold higher, respectively, than the production of HirJM79 by *E. hirae* DCH5. The production of HirJM79 by derivatives of *L. lactis* NZ9000 carrying the pNZH3 and pNZH4 recombinant vectors was also 4.7- to 8.5-fold higher, respectively, than that of *E. hirae* DCH5. The production of HirJM79 was higher in the *L. lactis* strains carrying the plasmids pJPH2 and pNZH4 than in those transformed with pJPH1 and pNZH3. However, the antimicrobial activities and the specific antimicrobial activities of these *L. lactis* transformants was lower than expected from their production of HirJM79. The transformation of *L. lactis* DPC5598, a NisA producer strain, with the recombinant pJPH1 and pJPH2 plasmids permitted the coproduction of HirJM79 and NisA, as determined by ADT and an NCI-ELISA (Fig. 1A and B). The production of HirJM79 by *L. lactis* DPC5598(pJPH1) and *L. lactis* DPC5598(pJPH2) was 4.1- to 5.6-fold greater, respectively, than that by *E. hirae* DCH5. The production of

NisA by *L. lactis* DPC5598(pMG36c) and by its two HirJM79⁺ derivatives was similar but lower (41% to 53%) than that of *L. lactis* BB24 (Table 3). The *Lactobacillus sakei* strain Lb790(pJPH1) and the *L. sakei* Lb790(pJPH2) transformants also produced larger quantities of HirJM79 than *E. hirae* DCH5 did, although the antimicrobial activities and the specific antimicrobial activities of both derivatives were lower than expected from their production of HirJM79. The *E. faecium* L50/14-2(pJPH2) and *E. faecalis* JH2-2(pJPH2) strains were slightly greater producers of HirJM79 than *E. hirae* DCH5, although they displayed a higher antimicrobial activity (Table 3).

Cloning and heterologous production of HirJM79 by *P. pastoris*. The *P. pastoris* X-33TH clone was selected for its high level of antagonistic activity from among different *P. pastoris* X-33 derivatives carrying the integrated pPIC5 plasmid, by using the stab-on-agar test (results not shown). The heterologous production of HirJM79 by *P. pastoris* X-33TH was further evaluated and quantified by an ADT, an MPA, and an NCI-ELISA. As shown in Fig. 2, the supernatants of *P. pastoris*

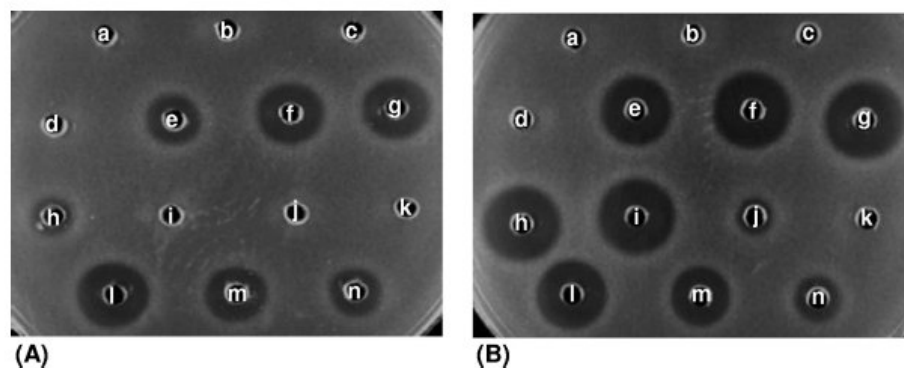


FIG. 2. ADT for detection of the HirJM79 antimicrobial activity against *E. faecium* T136. Wells contain supernatants of *P. pastoris* X-33TH grown in (A) the BMM medium or (B) the BMMY complex medium after 0 (d), 4 (e), 6 (f), 8 (g), 10 (h), 12 (i), and 24 (j) h of incubation. Supernatants of *P. pastoris* X-33 cultures grown in BMM or BMMY medium for 0 (a), 6 (b), and 12 (c) h were used as negative controls. Supernatants of *E. hirae* DCH5, not diluted (l), 4-fold diluted (m), and 16-fold diluted (n), were used as positive controls, and the supernatant of *E. faecium* T136 (k) was used as a negative control.

X-33TH grown in BMM medium produced smaller halos of inhibition (Fig. 2A) than the supernatants of the same culture grown in the BMMY complex medium (Fig. 2B). Moreover, the antimicrobial activity of cultures grown in BMMY medium lasted longer than that of cultures grown in BMM medium. The results shown in Table 4 also indicate that the maximum production of HirJM79 during the growth of *P. pastoris* X-33TH in BMM medium represents a 5.0-fold increase over the production by *E. hirae* DCH5, but its maximum antimicrobial activity was 33%, and its maximum specific antimicrobial

activity was 9% of the HirJM79 produced by *E. hirae* DCH5. However, the maximum production of HirJM79 by *P. pastoris* X-33TH grown in BMMY medium was 2.0-fold higher, and its maximum antimicrobial activity was 76% of the production and activity of the HirJM79 produced by *E. hirae* DCH5. The maximum specific antimicrobial activity of the HirJM79 produced by *P. pastoris* X-33TH grown in BMMY medium was 42% of the HirJM79 produced by *E. hirae* DCH5. Purification of the antimicrobial peptide produced by *P. pastoris* X-33TH grown in BMMY medium permitted a 2,804-fold increase of its specific activity and a 9% recovery of the initial antimicrobial activity (Table 5). MALDI-TOF mass spectrometry analysis of the purified antagonistic peptide of *P. pastoris* X-33TH showed a major peak at 5,093.2 Da, suggesting that the peptide was purified to homogeneity (results not shown).

TABLE 4. Production and antimicrobial activity of HirJM79 from supernatants of *Pichia pastoris* X-33TH grown in different media^a

Medium	Incubation time (h)	OD ₆₀₀	HirJM79 production (μg/mg cell dry wt) ^b	Antimicrobial activity (BU/mg cell dry wt) ^c	Specific antimicrobial activity (10 ³ BU/μg HirJM79) ^d
BMM	0	1.0	NE	NA	NE
	2	1.1	NE	NA	NE
	4	1.4	2.25	1,078	0.47
	6	1.7	6.57	2,278	0.34
	8	2.2	5.70	2,120	0.37
	10	2.5	3.43	94	0.03
	12	2.4	3.44	NA	NE
	24	2.1	3.25	NA	NE
	48	3.2	1.50	NA	NE
BMMY	0	1.0	NE	NA	NE
	2	1.3	1.03	923	0.89
	4	2.3	1.50	1,453	0.96
	6	2.9	2.75	3,995	1.45
	8	3.6	2.33	5,217	2.23
	10	4.0	2.01	3,729	1.85
	12	5.1	1.35	2,352	1.74
	24	4.8	0.12	NA	NE
	48	5.3	0.09	NA	NE

^a BMM medium and BMMY complex medium are described in the text.

^b HirJM79 production was calculated by an NCI-ELISA using polyclonal antibodies specific for HirJM79. NE, not evaluable.

^c Antimicrobial activity was calculated by MPA against *E. faecium* T136 (HirJM79⁺). NA, no activity. BU, bacteriocin unit.

^d Specific antimicrobial activity refers to the antimicrobial activity against *E. faecium* T136 divided by the HirJM79 produced.

DISCUSSION

The cloning and production of HirJM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *E. hirae* DCH5, have been evaluated in heterologous LAB strains and *P. pastoris*. All recombinant LAB strains displayed antagonistic activity (Fig. 1), confirming that *hirJM79* is the minimum requirement for the production of biologically active HirJM79 in bacteriocin-resistant hosts (42). Contrary to many studies that report the heterologous expression of antimicrobial peptides by using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting analyses, the use of specific anti-HirJM79 antibodies and an NCI-ELISA permitted the detection and quantification of HirJM79 production by recombinant LAB strains. The production of HirJM79 by all LAB strains was higher than that by *E. hirae* DCH5 (Table 3), whereas the production of HirJM79 in *L. lactis* IL1403 was larger than that in *L. lactis* NZ9000 transformed with the same vectors. Differences in the production of bacteriocins by lactococcal strains have been reported previously (23, 28, 37, 38) and may reflect unknown metabolic differences between *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 and *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000. The increased antimicrobial activity of *L. lactis* NZ9000, transformed with pNZH3 and pNZH4, may be ascribed to the short induction time for HirJM79 pro-

TABLE 5. Purification of the antimicrobial activity of *P. pastoris* X-33TH

Purification stage	Vol (ml)	Total A_{254} ^a	Total activity (10 ³ BU) ^b	Sp act (BU/ A_{254}) ^c	Increase in sp act (fold) ^d	Yield (%)
Culture supernatant	400	2,880	6,225	2,161	1	100
Ammonium sulfate precipitation	40	424	8,192	19,320	9	131
Gel filtration chromatography	80	112	1,232	10,928	5	19
Cation-exchange chromatography	50	2.5	1,341	536,640	248	21
Hydrophobic interaction chromatography	10	0.53	1,107	2,088,679	966	17
Reverse-phase chromatography	0.24	0.10	606	6,062,000	2,804	9

^a Absorbance at 254 nm multiplied by the volume in milliliters.^b Antimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml) multiplied by the total volume.^c Specific activity is the number of bacteriocin units divided by the total A_{254} .^d The specific activity of a fraction divided by the specific activity of the culture supernatant.

duction, which most probably prevents HirJM79 from attaching to cell walls, forming aggregates, and/or undergoing proteinase degradation.

Coexpression of the *hirJM79* and *hirI* genes increased the production of HirJM79 by all lactococcal hosts. Increased HirJM79 production may be explained by assuming that *L. lactis* is relatively resistant to HirJM79, but it may endure more of the bacteriocin when it expresses the HirJM79 product. Indeed, bacteriocin producers are protected from their own bacteriocin by the concomitant expression of a cognate immunity protein. These proteins act either by affecting bacteriocin aggregation and pore formation or by disturbing the interaction between the bacteriocin and the membrane-located bacteriocin receptor (23). Coexpression of the structural and immunity genes also increased the heterologous production of enterocin P (EntP), a Sec-dependent bacteriocin produced by *E. faecium* P13 in lactococci (23). The production of HirJM79 also depended on the lactococcal vector used (Table 3). The enhanced HirJM79 production in *L. lactis* NZ9000, using the nisin-inducible constructs, may be due to copy number differences between pNZ8048 and pMG36c but, more likely, is caused by the different promoters used to drive gene expression (13, 32).

Recombinant *L. lactis* strains able to coexpress NisA and HirJM79 were constructed by using *L. lactis* subsp. *lactis* DPC5598, a plasmid-free derivative of an industrial strain producer of NisA (45). The low production of HirJM79 by the recombinant *L. lactis* DPC5598 derivatives compared to that achieved by *L. lactis* IL1403 transformed with the same plasmids may be attributed to the production of more than one bacteriocin in multibacteriocinogenic hosts or to the genomic or metabolic differences between the strains or, most probably, to the higher proteinase activity of *L. lactis* DPC5598 (23). The low production of NisA by the *L. lactis* DPC5598 transformants compared to that of *L. lactis* BB24 may also be ascribed to unknown genetic and/or metabolic differences between the strains. Since NisA is particularly active against clostridia and their spores and HirJM79 is a wide-spectrum bacteriocin with antilisterial activity, these recombinant strains with antagonistic synergy would be of biotechnological interest for the food industry. The production of HirJM79 was higher in *Lactobacillus sakei* Lb790 than in *E. faecium* L50/14-2 and *E. faecalis* JH2-2, although the *E. faecium* L50/14-2(pJPH2) and the *E. faecalis* JH2-2(pJPH2) hosts produced slightly larger amounts of HirJM79 than *E. hirae* DCH5. *E. faecium* L50/14-2(pJPH2) was also a coproducer of EntP and HirJM79. These results

indicate the functionality of the $SP_{HirJM79}$ to drive the efficient secretion of HirJM79 in LAB strains. The secretory production of proteins provides advantages compared to cytosolic production, and protein secretion is a preferred means of protein expression for LAB as vehicles for the delivery of biologically active molecules (14).

However, the antimicrobial activity and the specific antimicrobial activity of the HirJM79 produced by most of the heterologous LAB were lower than that expected from their production of HirJM79 (Table 3). Since purification of HirJM79 from *L. lactis* IL1403(pJPH1) and *E. hirae* DCH5 yielded, according to MALDI-TOF analysis, fragments of identical molecular masses (42), this suggests that HirJM79 is processed and exported adequately out of the *L. lactis* cells. Thus, it is possible to speculate that disulfide bond formation (DSB) in HirJM79 (between Cys 10 and Cys 15) is not performed adequately by lactococci. DSB is a universally conserved mechanism for stabilizing extracytoplasmic proteins, carried out by thiol-disulfide oxidoreductases, which catalyze the formation, disruption, or isomerization of disulfide bonds in proteins (31). However, the function of the thiol-disulfide oxidoreductases in most bacteria remains largely unexplored (33). Although *L. lactis* has the capacity to synthesize proteins containing DSB, the genome sequencing of several strains has not revealed lactococcal homologs of genes involved in DSB in other bacteria (17). Alternatively, the bacteriocin could undergo conformational modifications, rendering less active extracellular HirJM79 forms. It may also happen that the posttranslational processing of pre-HirJM79 to active HirJM79 may be less efficient in *Lactococcus* than in *Enterococcus*, as it may occur with bacteriocins heterologously produced by *Lactobacillus* and *Pediococcus* (15, 28).

A higher aggregation of HirJM79 and/or a higher proteolytic activity of the lactococcal bacteriocin-producing hosts may also reflect the lower antimicrobial activity of the HirJM79 produced by the lactococcal strains and *Lactobacillus sakei* Lb790. EntP, a Sec-dependent class II.1 bacteriocin closely related to HirJM79, tends to form aggregates that reduce its biological activity (20). However, *E. faecium* L50/14-2(pJPH2) and *E. faecalis* JH2-2(pJPH2) produce HirJM79 with a higher specific antimicrobial activity than that of *E. hirae* DCH5. Since the HirJM79 produced by *E. hirae* DCH5 is identical to the bacteriocin T8 produced by *E. faecium* T8 and to the bacteriocin 43 produced by *E. faecium* VRE82 and shows homology with the bacteriocin RC714 produced by *E. faecium* RC714 and the bacteriocin 31 produced by *E. faecalis* Y1717 and with the

EntP produced by *E. faecium* P13 (42), it is possible to speculate that *E. faecium* and *E. faecalis* behave as more efficient hosts for the production of HirJM79 than *E. hirae* does. Nevertheless, the HirJM79 produced by the recombinant lactococcal hosts or added as cell-free cultures may be attractive for biotechnological applications. The use of "food grade" organisms as producing strains may also provide a means by which the potential benefits of antimicrobial compounds can be exploited in food.

The production of bacteriocins by heterologous hosts may be based on the expression of native biosynthetic genes, the exchange of leader peptides, and/or the dedicated secretion and processing systems (ATP-binding cassette transporters) or the fusion of mature bacteriocins to signal peptides that act as secretion signals (23). As reported in this work, the high-level production of HirJM79 by LAB hosts suggests that the production of this bacteriocin by the Sec pathway is efficient in *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, *E. faecium*, and *E. faecalis*. It remains unclear why most LAB bacteriocins have a dedicated processing and secretion system when they can access the Sec pathway if it is provided with an appropriate signal peptide. Fusions between the SP_{HirJM79} and the mature part of other bacteriocins may allow LAB strains to secrete bacteriocins in the absence of specific immunity and secretion proteins. Chimeras of pediocin PA-1 (PedA-1) and enterocin A (EntA) fused to the signal peptide of EntP (SP_{EntP}) have permitted the production and functional expression of these bacteriocins in *L. lactis* (37, 38). However, further efforts to improve the antimicrobial activity of the HirJM79 produced by LAB would be desirable. Construction of the *L. lactis* strain deficient in both of its major proteases, intracellular (ClpP) and extracellular (HtrA), may show its usefulness for the production of more stable heterologous peptides (9). The production of peptides with DSB is also a challenge for the development of LAB strains engineered for the expression of biologically active peptides (17).

Heterologous expression systems for the production and secretion of bacteriocins are being developed in bacteria. However, yeasts have not been fully exploited as alternative hosts for the production of bacteriocins. In this work, the heterologous production and functional expression of HirJM79 in *P. pastoris*, a methylotrophic yeast (29), have been achieved. The pPICZαA plasmid was selected as the expression vector because it contains the *Saccharomyces cerevisiae* alpha mating factor (prepro) signal sequence to target fused proteins to the *P. pastoris* secretory pathway, a methanol-inducible promoter, and the AOX1 region that allows integration of the vector into the 5' AOX1 locus of the *P. pastoris* X-33 genome. The high production of HirJM79 in the BMM medium compared to that in the BMMY complex medium may be ascribed to a better antigen epitope recognition of HirJM79 by the anti-HirJM79 antibodies in the former than in the latter medium. The activity of neutral proteases may also be responsible for the reduced antimicrobial activity of supernatants of *P. pastoris* X-33TH grown in BMM compared to that of supernatants grown in BMMY medium (Table 4). Nevertheless, the production of HirJM79 by *P. pastoris* X-33TH grown in BMMY medium was higher than that in the enterococci, including that of *E. hirae* DCH5, but not in lactobacilli and lactococci, although its antimicrobial activity and specific antimicrobial activity were

lower than expected from their production of HirJM79 (Table 4). Since purified HirJM79 from *P. pastoris* X-33TH (results not shown) and from *E. hirae* DCH5 (41) show identical molecular masses, this suggests that posttranslational events typical of yeasts (12) have not occurred. Thus, it seems that the activity of neutral proteases may be also responsible for the loss of antimicrobial activity of supernatants of *P. pastoris* X-33TH grown in BMMY medium. Although other bacteriocins such as pediocin PA-1 (2, 44) and plantaricin 423 (48) have been produced by recombinant *S. cerevisiae* and *P. pastoris* hosts, no inhibitory activity was detected in their supernatants. Currently, only EntP (21) and HirJM79 stand as biologically active bacteriocins produced by *P. pastoris*. The production and antimicrobial activity of HirJM79 in the supernatants of *P. pastoris* X-33TH may facilitate future biotechnological applications of this bacteriocin as a natural antimicrobial peptide in food, pharmaceutical, veterinary, and medical applications. However, before large-scale applications of this bacteriocin are attempted, further strategies for the optimal production of HirJM79 by the recombinant *P. pastoris* hosts should be developed.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Paul Ross (Teagasc Dairy Products Research Centre, Moorepark, Fermoy, County Cork, Ireland) for providing *L. lactis* DPC5598, Jan Kok (Department of Genetics, University of Groningen, The Netherlands) for supplying plasmid pMG36c, and Rosa del Campo (Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain) for supplying the strain JH2-2. The help of Jorge Gutiérrez is also recognized.

This work was supported in part by grants AGL2003-01508 and AGL2006-01042 from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) and by grant S-0505/AGR/0265 from the Comunidad de Madrid (CAM), Spain.

J. Sánchez holds a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD), Spain. J. Borrero holds a research contract from the CAM, and A. Basanta received an FPI fellowship from the CAM, Spain. B. Gómez-Sala holds a research contract from Innaves S.A. (Vigo, Spain).

REFERENCES

1. Ankrust, T. W., M. B. Brurberg, and I. F. Nes. 1995. Transformation of lactobacilli by electroporation. *Methods Mol. Biol.* 47:201-208.
2. Beaulieu, L., D. C. Groleau, B. Míguez, J. F. Jetté, H. Aomari, and M. Subirade. 2005. Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Protein Expr. Purif.* 43:111-125.
3. Casaus, P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143:2287-2294.
4. Chopin, M. C., A. Chopin, A. Moillo-Bott, and P. Langella. 1984. Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* 11:260-263.
5. Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Håvarstein, P. E. Hernández, and I. F. Nes. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4321-4330.
6. Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández, and P. E. Hernández. 1998. Comparative antimicrobial activity of pediocin PA-1, enterocin L50, nisin A, and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15:289-298.
7. Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández, and I. F. Nes. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182:6806-6814.
8. Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes, and P. E. Hernández. 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 7:281-305.
9. Cortes-Perez, N. G., I. Poquet, M. Oliveira, J. J. Gratacos, S. M. Madsen, A. Miyoshi, G. Corthier, V. Azevedo, P. Langella, and L. G. Bermúdez-

- Humarán. 2006. Construction and characterization of a *Lactococcus lactis* strain deficient in intracellular ClpP and extracellular HtrA proteases. *Microbiology* 152:2611–2618.
10. Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:777–788.
11. Criado, R., D. B. Diep, A. Aakra, J. Gutiérrez, I. F. Nes, P. E. Hernández, and L. M. Cintas. 2006. Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:6653–6666.
12. Daly, R., and M. T. W. Hearn. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18:119–138.
13. De Vos, W. M. 1987. Gene cloning and expression in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:281–295.
14. Dleye, Y., A. J. W. Hoekman, F. Clier, V. Juillard, H. J. Boot, and J. C. Piard. 2003. Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigens: a crucial step for development of live vaccines. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7281–7288.
15. Ennahar, S., D. Aoude-Werner, O. Sorokine, A. van Dorsselaer, F. Bringel, J. C. Hubert, and C. Hassemann. 1996. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4381–4387.
16. Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel, and A. Gálvez. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:293–310.
17. Freitas, D. A., S. Leclerc, A. Miyoshi, S. C. Oliveira, P. S. M. Sommer, L. Rodrigues, A. Correa, M. Gautier, P. Langella, V. A. Azevedo, and Y. Le Loir. 2005. Secretion of *Streptomyces tendae* antifungal protein 1 by *Lactococcus lactis*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38:1585–1592.
18. Gasson, M. J. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154:1–9.
19. Guinane, C. M., P. D. Cotter, C. Hill, and R. P. Ross. 2005. Microbial solutions to microbial problems: lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J. Appl. Microbiol.* 98:1316–1325.
20. Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, M. F. Fernández, L. M. Cintas, and P. E. Hernández. 2004. Performance and applications of polyclonal anti-peptide antibodies with specificity for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *J. Agric. Food Chem.* 52:2247–2255.
21. Gutiérrez, J., R. Criado, M. Martín, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández. 2005. Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3004–3008.
22. Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas, and P. E. Hernández. 2005. Cloning, production and functional expression of enterocin P, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 103:239–250.
23. Gutiérrez, J., R. Larsen, L. M. Cintas, J. Kok, and P. E. Hernández. 2006. High-level heterologous production and functional expression of the sec-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:41–51.
24. Hancock, R. E. W., and H.-G. Sahl. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24:1551–1557.
25. Håvarstein, L. S., D. B. Diep, and I. F. Nes. 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* 16:229–240.
26. Herranz, C., and A. J. M. Driessen. 2005. Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1959–1963.
27. Holo, H., and I. F. Nes. 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3119–3123.
28. Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M. Rodríguez, and H. M. Dodd. 1998. Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcal A secretory apparatus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:818–823.
29. Ilgen, C., J. Lin-Cereghino, and J. M. Cregg. 2005. *Pichia pastoris*, p. 143–162. In G. Gellisen (ed.), *Production of recombinant proteins. Novel microbial and eukaryotic expression systems*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany.
30. Jacob, A. E., and S. J. Hobbs. 1974. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J. Bacteriol.* 117:360–372.
31. Kadokura, H., F. Hatzen, and J. Beckwith. 2003. Protein disulphide bond formation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 72:111–135.
32. Kok, J., M. B. Jos, M. van der Vossen, and G. Venema. 1984. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:726–731.
33. Kouwen, T. R., A. van der Goot, R. Dorenbos, T. Winter, H. Antelmann, M. C. Plaisier, W. J. Quax, J. M. van Dijk, and J.-Y. F. Dubois. 2007. Thiol-disulphide oxidoreductase molecules in the low-GC Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 64:984–999.
34. Kuipers, O. P., P. G. G. A. de Ruyter, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos. 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64:15–21.
35. Kuipers, A., J. Wirenga, R. Rink, L. D. Kluskens, A. J. M. Driessen, O. P. Kuipers, and G. N. Moll. 2006. Sec-mediated transport of posttranslationally dehydrated peptides in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7626–7633.
36. Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández. 2006. Genes encoding bacteriocins and their expression, and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Prot.* 69:520–531.
37. Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández. 2007. Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:667–675.
38. Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández. 2007. Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. *J. Food Prot.* 70:2792–2798.
39. Martínez, J. M., M. I. Martínez, A. Suárez, C. Herranz, P. Casaus, L. M. Cintas, J. M. Rodríguez, and P. E. Hernández. 1998. Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4536–4545.
40. Nes, I. F., D. B. Diep, and H. Holo. 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189:1189–1198.
41. Sánchez, J., A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández. 2007. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117:295–305.
42. Sánchez, J., D. B. Diep, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas, and P. E. Hernández. 2007. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol. Lett.* 270:227–236.
43. Schillinger, U., and F. K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1901–1906.
44. Schoeman, H., M. A. Vivier, M. du Toit, L. M. T. Dicks, and I. S. Pretorius. 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:647–656.
45. Suárez, A. M., J. M. Rodríguez, P. E. Hernández, and J. I. Azcona. 1996. Generation of polyclonal antibodies against nisin: immunization strategies and immunoassay development. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2117–2121.
46. Trotter, M., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and A. Coffey. 2002. *Lactococcus lactis* DPC5598, a plasmid-free derivative of a commercial starter, provides a valuable alternative host for culture improvement studies. *J. Appl. Microbiol.* 93:134–143.
47. van de Guchte, M., J. M. van der Vossen, J. Kok, and G. Venema. 1989. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:224–228.
48. Van Reenen, C. A., M. L. Chikindas, W. H. van Zyl, and L. M. T. Dicks. 2002. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 81:29–40.
49. van Wely, K. H. M., J. Swaving, R. Freudl, and A. J. M. Driessen. 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:437–454.
50. Wu, J., S. Hu, and L. Cao. 2007. Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3131–3135.

CAPÍTULO VI

Enterococcus faecalis DBH18, AISLADO
DE ÁNADES REALES (*Anas platyrhynchos*),
CODIFICA LOS GENES *ef1097* Y
entL50A-entL50B, RESPONSABLES DE
LA PRODUCCIÓN DE
BACTERIOCINAS, Y UN GEN SIMILAR
AL *entL50B* DENOMINADO *entJS*

CHAPTER VI

Enterococcus faecalis DBH18, ISOLATED
FROM MALLARD DUCKS (*Anas*
platyrhynchos), ENCODES THE
BACTERIOCIN-PRODUCING GENES
ef1097, *entL50A-entL50B* AND AN *entL50B*-
LIKE GENE, TERMED *entJS*

Manuscrito en preparación

Enterococcus faecalis* DBH18, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*), encodes the bacteriocin-producing genes *ef1097*, *entL50A-entL50B* and an *entL50B*-like gene, termed *entJS

Jorge Sánchez,¹ Dzung B. Diep,² J. Borrero,¹ Carmen Herranz,¹ Ingolf F. Nes,² Luis M. Cintas,¹ and Pablo E. Hernández^{1*}

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain,¹ and Laboratory of Microbial Gene Technology, Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, P.O. Box 5003, N-1432 Ås, Norway²

Running title: Enterocins encoded by *Enterococcus faecalis* DBH18

Keywords: Enterocins; enterocin L50 (EntL50A and EntL50B); enterocin JS; *Enterococcus faecalis*; Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*); heterologous production

* Corresponding author:

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid, Spain
Phone: +34-913943752
Fax: +34-913943743
E-mail: ehernan@vet.ucm.es

ABSTRACT

Purified genomic DNA from *Enterococcus faecalis* DBH18, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*), was PCR-amplified with primers derived from *ef1097*, encoding the enterococcin V583 produced by *E. faecalis* V583, and from *entL50A-entL50B* of *Enterococcus faecium* L50, producer of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B). Nucleotide sequencing of the amplified fragments indicates that *E. faecalis* DBH18 encodes *ef1097*, *entL50A-entL50B* and an *entL50B*-like gene, termed *entJS*. The *entL50A-entL50B* sequence was identical in *E. faecalis* DBH18 and in *E. faecium* L50, although nested PCR results suggest that these genes in *E. faecalis* DBH18 may be located in a different genetic locus than in *E. faecium* L50. Further sequencing of fragments containing *entJS* from *E. faecalis* DBH18 revealed three putative open reading frames (ORFs). The first *orf* (*entJS*) encodes a predicted 43-amino-acid peptide of 5,182.2 Da, the second (*orfB*) encodes a predicted 89-amino-acid protein of 10,636.2 Da, and the third (*orfC*) encodes a predicted 89-amino-acid protein of 10,552.8 Da. The evaluation of the antimicrobial activity of the *entJS* gene product (EntJS) obtained by an *in vitro* combined transcription/translation assay and the heterologous production of EntJS by *Pichia pastoris*, suggest that *entJS* is the only gene for production and biological expression of the antimicrobial peptide enterocin JS (EntJS). *E. faecalis* DBH18 encodes multiple bacteriocins whose nucleotide sequence and antimicrobial activity may not be limited to defined enterococcal species nor to the food, clinical or environmental origin of the enterococcal strains.

INTRODUCTION

The enterococci are lactic acid bacteria (LAB) that are important in environmental, food, and clinical microbiology. They compete with other bacteria due to the production of ribosomally synthesized peptides or proteins with antimicrobial activity, generally referred to as enterocins, with different spectra of antagonistic activities, structures, and processing and secretion mechanisms (Cintas et al., 2001; Franz et al., 2007; Nes et al., 2007). Considerable research interest has focused on bacteriocins produced by LAB because of their potential as natural and nontoxic food preservatives and for pharmaceutical, nutraceutical, veterinary, and medical applications (Cotter et al., 2005; Deegan et al., 2006; Foulquié-Moreno et al., 2006; Gálvez et al., 2007). However, the enterococci are recognized as an important cause of nosocomial and, to a lesser extent, community-acquired infections. Moreover, due to the high incidence of infections produced by enterococci in young, old, and immunocompromised patients, they are being considered as emerging pathogens (Franz et al., 2001; Pillar and Gilmore, 2004; Coburn et al., 2007). Nevertheless, bacteriocinogenic enterococci from environmental, clinical, and food samples may find biotechnological applications provided their antimicrobial activity and hygienic and safety aspects are fully evaluated (Martín et al., 2006; Sánchez et al., 2007a; Gálvez et al., 2007).

Most bacteriocins from LAB are synthesized as biologically inactive precursors or prepeptides containing an N-terminal extension. The mature peptides are generally classified into the lanthionine-containing lantibiotics (class I), and the non-lanthionine-containing bacteriocins (class II) (Cotter et al., 2005). However, a new classification scheme groups the enterococcal bacteriocins in class I (lantibiotic), class II (non-lantibiotic), class III (cyclic), and class IV (large proteins). The class II comprises the class II.1 (pediocin-like), class II.2 (leaderless), and class II.3 (non-pediocin-like) enterocins (Franz et al., 2007). The N-terminal extensions of most lantibiotics and nonlantibiotics are of the so-called double-glycine type (leader sequence) and are cleaved off concomitantly with export across the cytoplasmatic membrane by dedicated adenosine triphosphate-binding cassette transporters (ABC-transporters) and their accessory proteins (Håvarstein et al., 1995; Venema et al., 1995). However, some class II bacteriocins contain N-terminal extensions of the so-called Sec type (signal peptide), which functions as a targeting and recognition signal and which is proteolytically

cleaved concomitantly with bacteriocin externalization by the Sec pathway (Van Wely et al., 2001; Herranz and Driessen, 2005; Gutiérrez et al., 2006). This pathway is a universally conserved protein translocation system that translocates unfolded proteins across the cell membrane via a protein-conducting pore formed by the SecYEG complex and a molecular motor, the ATPase SecA (Kuipers et al., 2006; Driessen and Nouwen, 2008). Leaderless bacteriocins, such as enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin Q, and enterocin EJ97 are thought to be exported through dedicated transport systems involving ABC-transporters or ABC-type multidrug resistance (MDR) transporters, which could also contribute to bacteriocin immunity (Criado et al., 2006a; Franz et al., 2007).

Enterococci isolated from wild animal species are being evaluated for their hygienic and safety aspects, and biotechnological potential (Martín et al., 2006; Sánchez et al., 2007a). The existence of *E. faecalis* strains with a potent antimicrobial activity and multiple virulence factors raises concerns regarding their potential pathogenicity to consumers. However, enterococcal bacteriocins heterologously produced by safer hosts or added as cell-free preparations may be still attractive for biotechnological applications as natural antimicrobial peptides in food, pharmaceutical, veterinary, and medical applications (Gutiérrez et al., 2006; Sánchez et al., 2008). In this study we report that *E. faecalis* DBH18, previously isolated from Mallard ducks (*A. platyrhynchos*) and encoding potential virulence factors (Sánchez et al., 2007a), encodes the bacteriocin-producing genes *ef1097*, *entL50A-entL50B* and an *entL50B*-like gene, termed *entJS*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, media, and growth conditions. *E. faecalis* DBH18 (Sánchez et al., 2007a) and *E. faecium* L50 (Cintas et al., 1998), were propagated in MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 32°C. Other LAB, food-spoilage, and food-borne pathogenic bacteria were used as indicators of the antimicrobial activity of *E. faecalis* DBH18 (Table 6). LAB strains were grown in MRS medium (Oxoid) at 32°C. *Listeria* spp. and *Staphylococcus* spp. were propagated in Brain Heart Infusion (BHI) medium (Oxoid) at 32°C. *Propionobacterium* spp. and *Clostridium* spp. were propagated in BHI medium (Oxoid) at 32°C and 37°C, respectively, in anaerobic jars. *Brocothrix thermosphacta* and *Pseudomonas fluorescens* were grown in TSB (Tryptone Soya Broth) medium (Oxoid), at 32°C. Cell dry weight determinations were performed as described (Sánchez et al., 2008). The correlation between cell dry weight (CDW) and optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was determined and used to calculate biomass concentrations. *E. coli* JM109 Competent Cells (Promega, Madison, WI, USA) were propagated in Luria-Bertani (LB) broth (Sigma) at 37°C, while *P. pastoris* X-33 was grown in yeast extract/peptone/dextrose (YPD) medium at 30°C. Agar plates were made by the addition of 1.5% (w/v) agar to the broth media. *E. coli* NovaBlue SinglesTM transformed cells used for *in vitro* transcription/translation of enterocin JS (EntJS) were selected on LB plates with carbenicillin (50 µg/ml), tetracycline (15 µg/ml), X-Gal (70 µg/ml) and IPTG (80 µM) at 37°C. *E. coli* carrying pPICZαA derivatives for heterologous expression of EntJS in *P. pastoris* X-33 were developed on LB plates with zeocin (25 µg/ml). *P. pastoris* X33 transformed cells were selected on YPD plates with zeocin (InvitrogenTM Life Technologies, Madrid, Spain) at 100 µg/ml and sorbitol (1 M) at 30°C for 3-10 days. The *P. pastoris* X-33JS clone was grown in the complex BMMY medium (1.34% yeast nitrogen base [YNB], 4 x 10⁻⁵% biotin and 100 mM potassium phosphate [pH 6], 0.5% methanol, 1% yeast extract and 2% peptone) at 30°C, to induce production of EntJS.

Bacteriocinogenic activity assays. Cell-free culture supernatants of *E. faecalis* DBH18, *E. faecium* L50, and *P. pastoris* X33-derived cultures were obtained by centrifugation at 12,000 g at 4 °C for 10 min, adjusted to pH 6.2 with 1 M NaOH, filtered through 0.25 µm pore-size sterile syringe filters (Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK),

and stored at -20°C. The antagonistic activity of supernatants was evaluated by the agar diffusion test (ADT) and, when stated, by a microtiter plate assay (MPA), performed as previously described (Cintas et al., 2000). With the MPA, growth inhibition of the sensitive microorganism was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtiter Labsystems iEMS plate reader (Helsinki, Finland). One bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the bacteriocin causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin). The antimicrobial activity and the synergistic effect of the *in vitro* synthesized peptides EntL50A, EntL50B, and EntJS, was tested individually and combined in a 1:1 ratio against different indicator microorganisms by the use of an spot-on-agar test (Cintas et al., 1998), and the MPA.

Basic genetic techniques. Purified genomic DNA was obtained using the Wizard® DNA Purification Kit (Promega, Madrid, Spain) or Advamax beads (Advanced Genetic Technologies Corp., Gaithersburg, MD, USA). PCR-amplifications were performed in 50 µl reaction mixtures with 1-3 µl of purified DNA, 70 pmol of each primer and 1 U of Platinum® *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (97°C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 45 sec), annealing (50 to 62 °C for 30 sec) and elongation (72 °C for 15 sec to 3 min), ending with a final extension step at 72°C for 7 min in a gradient thermal cycler Techne TC-512 (Techne, Cambridge, UK). The oligonucleotide primers used in this work, obtained from Sigma-Genosys (Cambridge, UK), are shown in Table 1. The PCR-generated fragments were analyzed by electrophoresis in 2% agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad). When required, the PCR-generated fragments were purified with the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) or by agarose gel electrophoresis, followed by extraction with a QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Nucleotide sequencing of purified PCR products was performed with the ABI PRISM® BigDye™ Terminator cycle sequencing kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For isolation and purification of resident plasmids, the cultures were processed with the QIAGEN Plasmid Mini and Midi Kits (QIAGEN) as described by the manufacturer, with addition of lysozyme (40 mg/ml) and mutanolysin (500 U/ml).

PCR-amplification of genomic DNA of *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50.

Purified genomic DNA of *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50 was used as template for amplification with primers EF1097-F3 and EF1097-R3 of a 468-bp fragment of *ef1097* of *E. faecalis* V583 (Swe et al., 2007). Similarly, primers shown in Table 1 and cited in Fig. 2 were used to amplify nucleotide fragments containing the enterocin L50A (EntL50A) and enterocin L50B (EntL50B) structural genes (*entL50A* and *entL50B*) and the surrounding ORFs (*orfG*, *orfF*, *orfE*, *orfD*, and *orfC*), as described in *E. faecium* L50 (Cintas et al., 1998). The 400-bp and 132-bp fragments, generated by PCR-amplification of genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 with primers L50J40-F/L50J40-R, and primers EntL50-R1/EntL50-R2, respectively, were subjected to nucleotide sequencing.

Nucleotide sequencing of the *entJS* gene and adjacent genes. Purified genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 was digested with the blunt-end restriction enzymes *HincII*, *Bsal*, *EcoRV*, *PvuII*, and *DraI* (New England BioLabs, Beverly, MA, USA), and ligated to the *EcoRV*-digested pCR-Blunt II-TOPO sequencing vector (Invitrogen). These ligation mixtures were used as templates in PCRs, which were carried out with combinations of specific primers deduced from the nucleotide sequence of the 132-bp fragment obtained from *E. faecalis* DBH18, and the vector-derived primers. The PCR-generated fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis, purified and sequenced, and new specific primers were deduced from sequencing of the resulting PCR products. Homology searches of the DNA sequences were performed with the BLAST algorithm (Altschul et al., 1997), available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Cloning of *entJS* in *Escherichia coli* and *in vitro* transcription/translation of the cloned fragment. Purified genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 was used as target DNA for PCR amplification of a 292-bp fragment (fragment A), with primers EntC-F and EntC-J, designed from the nucleotide sequence of *entJS* and adjacent genes. Fragment A was further used as DNA template for amplification of *entJS* (fragment JS, 132-bp) with primers EntC-F and EntC-R. Fragment JS was then cloned using the Perfectly Blunt™ Cloning Kit in the blunt vector pETBlue™-1 (Novagen Inc., Bionova, Madrid, Spain), according to the procedure recommended by the manufacturer. The resulting plasmid pETBlueJS was further transformed in *E. coli* NovaBlue Singles™ Competent

Cells (Novagen Inc.). Further identification and selection of colonies containing plasmid pETBlueJS with the fragment JS inserted in the correct orientation was performed by PCR amplification of DNA from single *E. coli* colonies with the primer pairs EntC-F/pETBlue1-Down, pETBlue1-Up/EntC-R, and pETBlue1-Up/pETBlue1-Down. Confirmation of the correct nucleotide sequence of fragment JS was performed by nucleotide sequencing of purified PCR-amplified fragments. The purified plasmid pETBlueJS was further used as template for the *in vitro* synthesis of the putative peptide product EntJS using the *E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain). EntL50A and EntL50B were also produced *in vitro* using the previously constructed plasmids pRSETB-*entL50A* and pRSETB-*entL50B* as templates (Cintas et al., 1998). The combined *in vitro* transcription/translation reactions were carried out at 37°C for 2 h, using plasmid pETBlue-1 as a control. The antimicrobial activity of the reaction products was determined by the spot-on-agar test and the MPA.

Heterologous production and functional expression of enterocin JS by *P. pastoris*. The EasySelect™ Pichia Expression Kit, the expression vector pPICZαA, and the wild type *Pichia pastoris* X-33 host were obtained from Invitrogen™ Life Technologies. The primers used for construction of the recombinant plasmids are listed in Table 1. Primers PJEC-F and PJEC-R were used for PCR-amplification from fragment JS of a 167-bp *XhoI-XbaI* fragment (insert PJ1), carrying the α-factor secretion signal peptide without the Glu-Ala spacer adjacent to the *kex2* protease cleavage site, fused to *entJS*. The insert PJ1 was digested with the above mentioned restriction enzymes and the resulting 151-bp *XhoI-XbaI* cleaved fragment was ligated into plasmid pPICZαA digested with the same enzymes, generating plasmid pPICJ1. Competent *E. coli* JM109 cells were transformed with pPICJ1, and the resulting transformants were confirmed by PCR amplification and nucleotide sequencing. Purified pPICJ1 was linearized with *SacI* and used to transform competent *P. pastoris* X-33 cells. The correct integration of the pPICJ1 genes was confirmed by a bacteriocinogenicity test, PCR and sequencing of the inserts.

ELISA assays, purification of enterocin JS, and mass spectrometry analyses. Polyclonal antibodies with specificity for EntL50A and EntL50B and a noncompetitive

indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), were used as described (Criado et al., 2006b). The EntJS produced by *P. pastoris* X-33JS was purified as previously described (Gutiérrez et al., 2005). Briefly, supernatants from 400 ml cultures grown in BMMY medium were subjected to precipitation with ammonium sulphate, applied to gel filtration PD-10 columns and further subjected to cation-exchange (SP Sepharose Fast Flow) and hydrophobic-interaction (Octyl Sepharose CL-4B) chromatographies, followed by a reverse-phase chromatography step in a C₂ to C₁₈ column (PepRPC HR 5/5) integrated in a FPLC system (RP-FPLC). All chromatographic columns and supporting gels were from Amersham Biosciences Europe GmbH (Cerdanyola, Spain). During purification, bacteriocin activity was calculated by a MPA using *P. damnosus* CECT4694 as the indicator microorganism. Purified fractions from the last RP-FPLC step were subjected to matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as previously described (Sánchez et al., 2007a).

RESULTS

Amplification and nucleotide sequencing of bacteriocin-producing genes of *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18. PCR-amplification of purified genomic DNA from *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18 with primers EF1097-F3 and EF1097-R3 showed that, contrary to that observed with *E. faecium* L50, the DNA template from *E. faecalis* DBH18 permitted amplification of a putative 468-bp fragment encoding *ef1097* (results not shown). Similarly, PCR-amplification of the same DNA templates with primers EntL50-R1 and EntL50-R2 showed that genomic DNA from *E. faecium* L50 permitted amplification of a unique fragment of a predicted 286-bp length, whereas that of *E. faecalis* DBH18 permitted amplification of two fragments of a predicted 286-bp length and a shorter fragment of around 130-bp length (Fig. 1). Further nucleotide sequencing of the 468-bp fragment from *E. faecalis* DBH18 revealed that it was identical to *ef1097* of *E. faecalis* V583, except for four minor nucleotide transitions and a nucleotide G to A transition which leads to a change in the amino acid sequence of the mature protein EF1097 (enterococcin V583), from tryptophan (TGG) to a transcription termination codon (i.e., TGG to TGA). This nucleotide transition was not present in the *ef1097* sequence of other *E. faecalis* isolates (strains JH2-2, DBH9 and DCH9) examined by our group (results not shown). Similarly, the nucleotide sequencing of the shorter (around 130-bp length) fragment amplified from *E. faecalis* DBH18 showed a nucleotide sequence of 132-bp, homologous but not identical, to that of *entL50B* of *E. faecium* L50. Nevertheless, the sequence of a larger 400-bp fragment, amplified with primers L50J40-F and L5040-R from genomic DNA of *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18, determined the existence of an identical *entL50A-entL50B* sequence in both, *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18 (results not shown). Nested PCR amplification of genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50 with primer pairs designed from *entL50A-entL50B* of *E. faecium* L50 and surrounding ORF's, suggested that genes adjacent to them are not identical in *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50 (Fig. 2). No resident plasmids were detected in *E. faecalis* DBH18 (results not shown).

Nucleotide sequence of the *entL50B-like* gene and adjacent genes of *E. faecalis* DBH18. The nucleotide sequencing of ligation mixtures of genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 permitted the elucidation of a DNA sequence of 901 contiguous

nucleotides containing an *entL50B-like* gene (GenBank accession number EF502034). Analysis of the nucleotide sequence revealed the presence of three putative open reading frames (ORFs) designated *entJS*, *orfB* and *orfC* (Fig. 3). The first *orf* encodes a predicted 43-amino-acid peptide with a calculated molecular weight of 5,182.25 Da. The second *orf* was found 220-bp downstream of the stop codon of *entJS* and encodes a putative protein of 89-amino-acids with a calculated molecular weight of 10,636.27 Da. The third *orf* was located immediately after *orfB* and encodes a putative protein of 89-amino-acids with a calculated molecular weight of 10,552.87 Da.

***In vitro* transcription/translation of the *entJS* gene of *E. faecalis* DBH18.** Plasmid pETBlueJS encoding *entJS* and plasmids pRSETB-*entL50A* and pRSETB-*entL50B* encoding, respectively, *entL50A* and *entL50B* (Cintas et al., 1998) were used as templates for the *in vitro* synthesis of EntJS, EntL50A and EntL50B. The antimicrobial activity of the synthesized peptides was tested separately and in a combined 1:1 ratio (v/v) (Table 2). The peptide product of *entJS* displays antagonistic activity by itself and in combination with EntL50A and EntL50B (results not shown). The combination of EntL50A with EntL50B or EntJS in a 1:1 ratio (v/v), showed a larger antimicrobial effect than the additive effect of the individual bacteriocins. The combination of EntL50B and EntJS showed a lower antagonistic effect than that of the individual enterocins. The combination of three different bacteriocins usually provided a lower antimicrobial activity than that of the binary combinations containing EntL50A. The synergism coefficient of the different bacteriocins combinations varies from 0.1- to 23.7-fold among the evaluated indicator microorganisms (Table 2).

Heterologous production of EntJS by *P. pastoris*. From different *P. pastoris* X-33 derivatives carrying the integrated plasmid pPICJ1, the *P. pastoris* X-33JS clone was selected for its high level antagonistic activity by the stab-on-agar test (results not shown). The heterologous production of EntJS by *P. pastoris* X-33JS was further evaluated and quantified by an ADT and a NCI-ELISA. Although *P. pastoris* X-33JS produced amounts of EntJS after 8 h growth, the maximum bacteriocin production, antimicrobial activity, and specific antimicrobial activity occurred after 192 h growth in the complex medium BMMY (Table 3). Purification of the antimicrobial activity of *P. pastoris* X-33JS grown in BMMY permitted a 26,420-fold increase of its specific antimicrobial activity and a 3% recovery of the initial antimicrobial activity (Table 4).

MALDI-TOF mass spectrometry analysis of the purified antagonistic activity of *P. pastoris* X-33JS showed fragments of a variable molecular mass (results not shown) suggesting that the recombinant EntJS was either modified, subjected to proteolytic attack or not purified to homogeneity.

Bacteriocin production and antimicrobial activity of supernatants of *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50. The production of bacteriocins and the antimicrobial activity of supernatants of *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50 grown in MRS are shown in Table 5. While EntL50A and EntL50B were produced at similar amounts by *E. faecium* L50, the production of EntL50B was 6.6-fold higher in *E. faecalis* DBH18 than in *E. faecium* L50. Although production of EntL50A was a 2.2-fold lower in *E. faecalis* DBH18 than in *E. faecium* L50 the antimicrobial activity of *E. faecalis* DBH18 is a 2.7-fold higher than in *E. faecium* L50. The antimicrobial activity and the inhibitory spectrum of supernatants from *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50 were also evaluated against different LAB and food-spoilage and food-borne pathogenic bacteria (Table 6). The antimicrobial activity of *E. faecalis* DBH18, as compared to that of *E. faecium* L50, was greater against indicators of the genus *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, and *Enterococcus* but not against those of the genus *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Listeria*, and *Staphylococcus*.

DISCUSSION

The *E. faecalis* DBH18 strain was isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*), during evaluation of the hygienic (antimicrobial activity) and safety aspects (virulence factors) related to the presence of enterococci in the intestine and carcasses of wild animal species profitable for human consumption and available from hunting (Sánchez et al., 2007a). Relevant to that study was the observation that all *E. faecalis* isolates carried virulence-associated genes and that all, except *E. faecalis* DBH18, showed a potent direct antimicrobial activity, while no antagonistic activity was detected in their supernatants. The production of antimicrobial peptides linked to the presence of potential virulence factors may contribute to the competitiveness of virulent *E. faecalis* in food and in the gastrointestinal tract.

In this study, the PCR-amplification of genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 identified a 468-bp fragment presumably containing *ef1097* encoding the enterococcin V583 (EntV583), produced by *E. faecalis* V583 (Paulsen et al., 2003; Swe et al., 2007). Amplification fragments of the same length were also identified in other *E. faecalis* isolates (strains DBC5, DCH9, DAC10, DBC16, DCC32, DAC9, DBH9, DBC4, and DEC23) from mallards, although none of the isolates showed antimicrobial activity in their supernatants (Sánchez et al., 2007a). Some LAB and other bacteria do not show antimicrobial activity despite of the presence of structural bacteriocin genes, indicating that other factors are required for bacteriocin activity (Lux et al., 2007; Sánchez et al., 2007a). However, the nucleotide sequencing of *ef1097* from *E. faecalis* DBH18 revealed minor nucleotide transitions without modification of the amino acid sequence, plus one G to A transition leading to a transcription termination codon at position 99 of the mature 136-amino-acid length EntV583. It is possible that this premature stop codon may be responsible for an attenuated antimicrobial phenotype. Nevertheless, the expression of *ef1097* seems to be tightly regulated in enterococci together with that of other known virulence factors (Bourgogne et al., 2006; Swe et al., 2007).

The amplification of genomic DNA from *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18 (Fig. 1), and sequencing of the obtained fragments determined that *E. faecalis* DBH18 encodes a 286-bp fragment identical to *entL50A-entL50B* of *E. faecium* L50, and a 132-bp fragment, homologous but not identical, to *entL50B* of *E. faecium* L50 (Cintas et al.,

1998). No other known enterocin genes seem to be present in *E. faecalis* DBH18 (Sánchez et al., 2007a). Bacteriocins with a high degree of similarity or identical to EntL50A and EntL50B are encoded or produced by *E. durans* (Batdorj et al., 2006) and other *E. faecium* strains of different origin (Moreno et al., 2002; Achemechen et al., 2005; Martín et al., 2006; Sánchez et al., 2007; Teppangna et al., 2007). Furthermore, nested PCR experiences suggest that *entL50A-entL50B* and their adjacent genes may be in a different location in *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50 (Fig. 2). The *entL50A-entL50B* are located on the 50-kb plasmid pCIZ1 of *E. faecium* L50 (Cintas et al., 2000; Criado et al., 2006a), in a 22-kb plasmid in *E. faecium* F58 (Achemechen et al., 2005), and in the 21-kb plasmid pEF1 of *E. faecium* 6T1a (Ruíz-Barba et al., 2006), although the plasmid-less strain of *E. faecium* BFE1072 and the plasmid-cured strain of *E. faecium* B2 also produced EntL50 (EntL50A and EntL50B). In this work, no resident plasmids were found in *E. faecalis* DBH18, suggesting that the *entL50A-entL50B* cluster may be integrated in the chromosome. An unprecedented amount of the *E. faecalis* V583 genome have complex mosaic structures suggesting they are “hot-spots” for mobile element insertion (Paulsen et al., 2003). Accordingly, further efforts would be performed towards elucidation of the adjacent genes in the vicinity of *entL50A-entL50B* in *E. faecalis* DBH18, which may contribute to the secretion of entL50A and EntL50B and/or to their mobilization and transfer among the enterococci.

Further nucleotide sequencing of a DNA fragment from *E. faecalis* DBH18 containing the *entL50B-like* gene revealed the presence of the putative ORFs *entJS*, *orfB*, and *orfC* (Fig. 3). The first *orf*, encoding a predicted 43-amino-acid sequence, shows twelve nucleotide changes respect to *entL50B* of *E. faecium* L50 (Cintas et al., 1998) at positions 20, 25, 26, 37, 44, 46, 49, 70, 76, 82, 119, and 132, which leads to two changes at the amino acid residues 9 (Thr to Ala) and 15 (Leu to Phe) of EntJS. A BLAST nucleotide sequence homology search revealed that *entJS* was identical to *entNB* (100% identity, GenBank AB292312) of *E. faecalis* N1-33, isolated from fermented vegetables (unpublished results). The *entJS* also displayed a high homology with *mr10B* (99% identity, GenBank DQ366596) of *E. faecalis* MRR 10-3 isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*) (Martín-Platero et al., 2006), with *ent62-B* (91% identity, GenBank EF112398) of a vaginal strain of *E. faecium* 62-6 (unpublished results), with *entJ* (91% identity, GenBank DQ198088) of *E. faecium* 6T1a isolated from olive fermentations (Floriano et al., 1998), and with *entL50B* (91% identity,

GenBank AJ223633) of *E. faecium* L50 isolated from fermented sausages (Cintas et al., 1998). However, whereas the two-peptide bacteriocins encoded by the gene pairs *entNA* and *entNB* (GenBank AB292312), *mr10A* and *mr10B* (Martín-Platero et al., 2006), *ent62-A* and *ent62-B* (GenBank EF112398), *entI* and *entJ* (Ruíz-Barba et al., 2006), and *entL50A* and *entL50B* (Cintas et al., 1998) are colinearly arranged and spaced by a short (<30-bp) intergenic region, presumably on a single transcription unit, efforts to obtain a sequence upstream of the *entJS* gene of *E. faecalis* DBH18 were unsuccessful. Other leaderless enterocins consisting of individual peptides are enterocin Q (Cintas et al., 2000), enterocin RJ-11 (Yamamoto et al., 2003), and enterocin EJ97 (Sánchez-Hidalgo et al., 2003).

Homology searches of the putative peptide encoded by *orfB* from *E. faecalis* DBH18 revealed a 100% identity with an hypothetical ORF of *E. faecalis* N1-33 (GenBank AB292312), a 89% identity with an hypothetical protein encoded by *E. faecium* 6T1a (GenBank DQ198088), and a 89% identity with the product of the *orfE* gene of *E. faecium* L50 (Cintas et al., 1998). The hypothetical peptide encoded by *orfC* revealed a 97% identity with an hypothetical ORF of *E. faecalis* N1-33 (GenBank AB292312). Further efforts would be desirable to elucidate the hypothetical role of *orfB* and *orfC* in the immunity and/or production of leaderless enterocins in *E. faecalis* DBH18.

Since purification of the peptide product of *entJS*, similar to that of *entL50B*, would have been difficult using biochemical procedures, the putative antimicrobial activity associated to the *entJS* gene product was determined by an *in vitro* combined transcription/translation assay. The synthesized EntJS displayed antimicrobial activity by itself and in combination with EntL50A or EntL50B (Table 2). These results suggest that *entJS* is the minimum requirement for the production and biological activity of the antimicrobial peptide EntJS, and that the peptide product is not posttranslationally modified. In this work the heterologous production and functional expression of *entJS* in *P. pastoris*, a methylotrophic yeast (Daly and Hearn, 2005; Ilgen et al., 2005), has been also achieved. The recombinant production of antibacterial peptides is a practical route to demonstrate that the peptide is responsible for the activity observed (Swe et al., 2007). Plasmid pPICZ α A was selected as the expression vector because it contains the *S. cerevisiae* alpha mating factor signal sequence (α -MF prepro) to target fused proteins to the *P. pastoris* secretory pathway. The production of EntJS was determined

using polyclonal antibodies specific for the C-terminal amino acid sequence of EntL50B and a NCI-ELISA (Criado et al., 2006b). Since the C-terminal end of EntL50B and EntJS are identical, the specific anti-EntL50B antibodies would recognize EntJS (Table 3). Other bacteriocins such as pediocin PA-1 (Schoeman et al., 1999; Beaulieu et al., 2005) and plantaricin 423 (Van Reenen et al., 2002) have been produced by recombinant *S. cerevisiae* and *P. pastoris* hosts, but no inhibitory activity was detected in their supernatants. Only enterocin P (EntP) and hiracin JM79 (HirJM79) stand as fully active bacteriocins produced by *P. pastoris* (Gutiérrez et al., 2005; Sánchez et al., 2008).

The use of polyclonal antibodies of predetermined activity against EntL50A and EntL50B (Criado et al., 2006b) have permitted the detection and quantification of EntL50A, EntL50B, and EntJS in the supernatants of *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50. The similar production of EntL50A and EntL50B by *E. faecium* L50 confirm that both enterocins are transcribed from a single transcription unit (Cintas et al., 1998). However, the production of EntL50A was lower in *E. faecalis* DBH18 than in *E. faecium* L50. The greater production of EntL50B (EntL50B + EntJS) by *E. faecalis* DBH18, as compared to *E. faecium* L50, would be ascribed to the production of EntJS by the former (Table 5). These results also suggest that the leaderless bacteriocin EntJS does not seem to be transcriptionally associated to *entL50A-entL50B*. Codon optimization and/or promoter and Shine-Dalgarno sequence optimization may account for a larger production of EntJS by *E. faecalis* DBH18. Only a single amino acid substitution dictates the difference between high and very poor secretion yields in *Bacillus subtilis* (Nijland et al., 2007). Thus, it is possible that differences in the amino acid sequence of EntJS, as compared to that of EntL50B, permit a more efficient secretion of EntJS by *E. faecalis* DBH18. The observation that *E. faecalis* DBH18 produces EntL50A, EntL50B, and EntJS is also interesting since previous results revealed that *E. faecium* DCH2 and *E. faecium* DCC14, encoding *entL50A-entL50B* and *entA*, respectively, were silent for production of either EntL50A, EntL50B or enterocin A (Sánchez et al., 2007a).

The antimicrobial activity of *E. faecalis* DBH18, as compared to that of *E. faecium* L50, was higher against some indicator bacteria, but not to others (Table 6). It may be argued that the sensitivity of the indicator microorganisms to the antimicrobial peptide mixtures varies among them (Table 2). Moreover, EntJS may be considered a

bacteriocin variant that may become useful in investigations about the role of amino acid substitutions in the antimicrobial activity, antagonistic spectrum and synergistic effects of enterocins. Peptide folding, peptide aggregation, sensitivity to proteinase attack, production of additional enterocins and other yet undescribed events, affecting the biochemical characteristics of the enterocins, may also account for the different antimicrobial activity of *E. faecalis* DBH18 as compared to that of *E. faecium* L50.

This study reports that *E. faecalis* DBH18 encodes bacteriocins present in *E. faecalis* (*ef1097*) and *E. faecium* (*entL50A-entL50B*) strains of food, clinical or environmental origin, suggesting that some enterocins may be widespread in enterococci and not related to the species and/or origin of the producer strain. This also confirms that production of multiple bacteriocins seems to be a common feature of enterococci (Nes et al., 2007). However, since *E. faecalis* DBH18 also encodes potential virulence factors (Sánchez et al., 2007a), this microorganism is of possible concern regarding its potential pathogenicity to persons with underlying diseases or an impaired immune system. The finding that *E. faecalis* virulence genes are present in food-associated isolates calls for safety assessment measures (Lepage et al., 2007). In the sake of a good microbiological practice the ingestion of foods containing enterococci showing high levels of virulence-factors and broad antimicrobial activity should be avoided. Accordingly, it should be recommended that mallards and other small game animals be eviscerated and defeathered longer before consumption (Martín et al., 2006; Sánchez et al., 2007a). Nevertheless, some of the enterocins evaluated in this study may find potential applications as natural antimicrobial agents in food, feed, pharmaceutical, veterinary, and medical applications. Further efforts to evaluate the production, regulation, immunity, secretion, and mobilization of the Sec-dependent EntV583 and the leaderless EntL50A, EntL50B, and EntJS bacteriocins produced by *E. faecalis* DBH18, constitutes an attractive scientific challenge in food microbiology, public health, and the bacteriocin-research field.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grants AGL2003-01508 and AGL2006-01042 from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), and by grant S-0505/AGR/0265 from the Comunidad de Madrid (CAM), Spain. The help of Dr. Jorge Gutiérrez and Dr. Raquel Criado is recognized. J. Sánchez held a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD), Spain, and J. Borrero holds a research contract from the Comunidad de Madrid (CAM), Madrid, Spain.

REFERENCES

- Achemchem, F., Martínez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E., Maqueda, M., 2005. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. J. Appl. Microbiol. 99, 141-150.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.
- Batdorj, B., Dalgarrondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Métro, F., Prévost, H., Chobert, J.M., Hartle, T., 2006. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. J. Appl. Microbiol. 101, 837-848.
- Beaulieu, L., Groleau, D.C., Míguez, B., Jetté, J.F., Aomari, H., Subirade, M., 2005. Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. Prot. Expr. Purif. 43, 111-125.
- Bourgogne, A., Hilsenbeck, S.G., Dunne, G.M., Murray, B.E., 2006. Comparaison of OG1RF and a isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the Fsr system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. J. Bacteriol. 188, 2875-2884.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F., Håvarstein, L.S., 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. J. Bacteriol. 180, 1988-1994.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F., 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel

- bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. J. Bacteriol. 182, 6806-6814.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Nes I.F., Hernández, P.E., 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Sci. Tech. Int. 7, 281-305.
- Coburn, P.S., Baghdayan, A.S., Dolan, G.T, Shankar, N. 2007. Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. Mol. Microbiol. 63, 530-544.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Rev. Microbiol. 3, 777-788.
- Criado, R., Diep, D., Aakra, Å , Gutiérrez, J., Nes, I.F., Hernández, P.E., Cintas, L.M., 2006a. Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pClZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. Appl. Environ. Microbiol. 72, 6653-6666.
- Criado, R., Gutiérrez, J., Martín, M., Herranz, C., Hernández, P.E., Cintas, L.M., 2006b. Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P and enterocin Q by the multiple bacteriocin producer strain *Enterococcus faecium* L50. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7634-7643.
- Daly, R., Hearn, M.T.W., 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. J. Mol. Recognit. 18, 119-138.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16, 1058-1071.
- Driessen, A.J.M., Nouwen, N. 2008. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. Annu. Rev. Biochem. 77, 1-25.
- Du Toit, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T., Holzapfel, W.H., 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. J. Appl. Microbiol. 88, 482-494.
- Floriano, B., Ruíz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R. 1998. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4883-4890.

- Foulquié-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silverhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancannet, M., Swings, J., Holzapfel, W.H., 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4835-4839.
- Franz, C.M.A.P., van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H., Gálvez, A., 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 293-310.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.I., Omar, N.B. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 120, 51-70.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Martín, M., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2005. Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3004-3008.
- Gutiérrez, J., Larsen, R., Cintas, L.M., Kok, J., Hernández, P.E., 2006. High-level heterologous production and functional expression of the sec-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 41-51.
- Håvarstein, L.S., Diep, D.B., Nes, I.F., 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* 16, 229-240.
- Herranz, C., Driessen A.J.M., 2005. Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1959-1963.
- Ilgen, C., Lin-Cereghino, J., Cregg, J.M., 2005. *Pichia pastoris*. In: G. Gellisen (Ed.), *Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems*. Willey-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, pp. 143-162.
- Kuipers, A., Wirenga, J., Rink, R., Kluskens, L.D., Driessen, A.J.M., Kuipers, O.P., Moll, G.N. 2006. Sec-mediated transport of posttranslationally dehydrated peptides in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7626-7633.
- Lepage, E., Brinster, S., Caron, C., Ducroix-Crepy, C., Rigottier-Gois, L., Dunny, G., Hennequet-Antier, C., Serror, P., 2006. Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: identification of genes absent from food strains. *J. Bacteriol.* 188, 6858-6868.

- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2006. Genes encoding bacteriocins and their expression, and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). J. Food Prot. 69, 520-531.
- Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., 2006. Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the Hoopoe (*Upupa epops*). Appl. Environ. Microbiol. 72, 4245-4249.
- Moreno, M.R., Leistner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Rusul, G., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., 2002. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. J. Appl. Microbiol. 92, 147-157.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Holo, H., 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. J. Bacteriol. 189, 1189-1198.
- Nijland, R., Heerlen, R., Hamoen, L.W., Kuipers, O.P., 2007. Changing a single amino acid in *Clostridium perfringens* β -toxin affects the efficiency of heterologous secretion in *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1586-1593.
- Paulsen, I., Banerjee, L., Myers, G.S.A., Nelson, K.E., Seshadri, R., Read, T.D., Fouts, D.E., Eisen, J.A., Gill, S.R., Heidelberg, J.F., Tettelin, H., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L., Beanan, M., Daugherty, S., DeBoy, R.T., Durkin, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., Vamathevan, J., Tran, B., Upton, J., Hansen, T., Shetty, J., Khouri, H., Utterback, T., Radune, D., Ketchum, K.A., Dougherty, B.A., Fraser, C.M., 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Science 299, 2071-2074.
- Pillar, C.M., Gilmore, M.S., 2004. Enterococcal virulence - pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. Front. Biosci. 9, 2335-2346.
- Ruíz-Barba, J.L., Floriano, B., Maldonado-Barragán, A., Jiménez-Díaz, R., 2006. Molecular analysis of the 21-kb bacteriocin-encoding plasmid pEF1 from *Enterococcus faecium* 6T1a. Plasmid 57, 175-181.
- Sánchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2007a. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). Int. J. Food Microbiol. 117, 295-305.

- Sánchez, J., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2007b. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). FEMS Microbiol. Lett., 270, 227-236.
- Sánchez, J., Borrero, J., Gómez-Sala, B., Basanta, A., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E. 2008. Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a *Sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2471-2479.
- Sánchez-Hidalgo, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M. 2003. The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1633-1641.
- Schoeman, H., Vivier, M.A., du Toit, M., Dicks, L.M.T., Pretorius, I.S., 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 15, 647-656.
- Swe, P.M., Heng, N.C.K., Ting, Y-T., Baird, H.J., Carne, A., Tauch, A., Tagg, J.R., Jack, R.W., 2007. *ef1097* and *ypkK* encode enterococcin V583 and corynicin JK, members of a new family of antimicrobial proteins (bacteriocins) with modular structure from Gram-positive bacteria. Microbiology 153, 3218-3227.
- Theppangna, W., Murase, T., Tokumaru, N., Chikumi, H., Otsuki, K., 2007. Screening of enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins. J. Vet. Med. Sci. 69, 1235-1239.
- Van Reenen, C.A., Chikindas, M.L., van Zyl, W.H., Dicks, L.M.T., 2002. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Food Microbiol. 81, 29-40.
- Van Wely, K.H.M., Swaving, J., Freudl, R., Driessen, A.J.M., 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 25, 437-454.
- Venema, K., Kok, J., Marugg, J.D., Toonen, M.Y., Ledeboer, A.M., Venema, G., Chikindas, M.L., 1995. Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus*

acidilactici PAC1.0: Pedb is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. Mol. Microbiol. 17, 515-522.

Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M., Okazaki, M., 2003. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5746-5753.

Legends to Figures

Figure 1. PCR-amplification fragments of purified DNA from *E. faecium* L50 (A) and *E. faecalis* DBH18 (B), using primers EntL50-R1 and EntL50-R2 and an annealing temperature gradient of 50.8° C (lane 1), 52.5° C (lane 2), 55.2° C (lane 3), 57.1° C (lane 4), 59.0° C (lane 5), 61.0° C (lane 6), 63.5° C (lane 7), and 64.9° C (lane 8). M, nucleic acid molecular size marker 100 bp DNA ladder.

Figure 2. Nested PCR amplification of purified genomic DNA from *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18 to amplify fragments containing the *entL50A* and *entL50B* genes and surrounding ORFs (*orfG*, *orfF*, *orfE*, *orfD*, and *orfC*). Results for *E. faecium* L50 (A). Lane 1, GL50B-F/EntL50-R2 (1.680-bp); lane 2, EL50B-F/EntL50-R2 (1.053-bp); lane 3, L50J45-F/L50J45-R (450-bp); lane 4, L50J40-F/L50J40-R (400-bp); lane 5, EntL50-R1/EntL50-R2 (286-bp and 132-bp); lane 6, EntL50-R1/L50AD-R (1.502-bp), and lane 7 EntL50-R1/L50AC-R (1.832-bp). Results for *E. faecalis* DBH18 (B). Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7, as described before. M, nucleic acid molecular size marker 100 bp DNA ladder.

Figure 3. Nucleotide sequence of a 901-bp fragment containing the predicted *entJS*, *orfB* and *orfC* genes. The deduced amino acid sequences are shown below the DNA sequence. Putative ribosome binding sites (RBS) are underlined.

Table 1. Oligonucleotides used in PCR-amplification reactions and DNA sequencing

Oligonucleotide	Nucleotide sequence (5' → 3')	Comments
EF1097-F3	GGCGATGGCATTACTAATGACATTAGG	Amplification of <i>ef1097</i>
EF1097-R3	CTTAGCCACATTGAACTGCCATAAAGC	Amplification of <i>ef1097</i>
EntL50-R1	ATGGGAGTAATCGCAAAATTAGTAGC	Amplification of <i>entL50AB</i>
EntL50-R2	TTAATGTCTTTTAGCCATTTTCAATTTGATC	Amplification of <i>entL50AB</i>
L50J40-F	AAAAATGATTGGAGGAGTTATATTATG	Nested PCR experiences
L50J40-R	CGAATGTTTACACAACAAAAAAC	Nested PCR experiences
GL50B-F	AAAACATATAGTCAGTCTCAATCACTG	Nested PCR experiences
EL50B-F	ATAACGCCCTTATGCTTT	Nested PCR experiences
L50J45-F	TTTGCAACAATACATCTTCTATG	Nested PCR experiences
L50J45-R	GGATATCCTTATAACTTTATAGTCTTTTTTC	Nested PCR experiences
L50AD-R	GAAAGGCCTACGGCTCAAG	Nested PCR experiences
L50AC-R	CTAACGGCTTCAGCATTTGA	Nested PCR experiences
JoC1F	GCAAAGTTTGGATGGCCATTTATT	Sequencing of <i>entJS</i> containing fragments
JoC2F	ATGGGAGCAATCGCAAAATTAGTA	Sequencing of <i>entJS</i> containing fragments
JoC3R	CATAATTTGTTGTAGAATTTTTTAATAAA	Sequencing of <i>entJS</i> containing fragments
JoC4R	TTAATGTCTTTTAGCCATTTTCAAT	Sequencing of <i>entJS</i> containing fragments
JoC5F	TACTATGAAATAATAAGTATATCCTTG	Sequencing of <i>entJS</i> containing fragments
JoC6R	TTAACATAAGATAATTTAAACATTTCC	Sequencing of <i>entJS</i> containing fragments
JoC6BR	GTAGAAAAAACTTGTTATTAACATAAG	Sequencing of <i>entJS</i> containing fragments
JoC6CR	AAATACTATGAAATAACAAGGATATAC	Sequencing of <i>entJS</i> containing fragments
EntC-F	ATGGGAGCAATCGCAAAATTAGTAGC	<i>In vitro</i> transcription/translation assay
EntC-J	CAACCTATACCATTAAGTCAAACGATATCAG	<i>In vitro</i> transcription/translation assay
EntC-R	TCAATGTCTTTTAACCATTTTCAATTTGATC	<i>In vitro</i> transcription/translation assay
PJEC-F	AATTATA CTCGAGAAAAGAATGGGAGCAATCGCAAAATTAGTAGC	Cloning of <i>entJS</i> in <i>P. pastoris</i>
PJEC-R	ATAAGTTTCTAGAATATCAATGTCTTTTAAACCATTTTCAATTTG	Cloning of <i>entJS</i> in <i>P. pastoris</i>

Table 2. Antimicrobial activity and synergistic antimicrobial activity of the *in vitro*-synthesized EntL50A, EntL50B and EntJS

Indicator Microorganism ^a	Antimicrobial activity (BU/ml) ^b						
	EntL50A	EntL50B	EntJS	EntL50A + EntL50B	EntL50A + EntJS	EntL50B + EntJS	EntL50A + EntL50B + EntJS
<i>L. monocytogenes</i> CECT4032	2,713	-	-	5,431	1,650	-	3,655
<i>E. faecium</i> P13	12,800	-	-	102,400	76,800	-	-
<i>P. acidilactici</i> 347	38,400	4,061	2,007	189,440	254,862	1,066	129,174
<i>Lb. buchnerii</i> CECT4674	204,800	34,300	34,974	5,684,240	4,369,065	21,333	993,453
<i>P. damnosus</i> CECT4797	819,200	85,333	109,985	2,574,628	2,325,470	92,160	1,288,339
<i>P. damnosus</i> CECT4694	1,193,563	221,450	756,869	5,543,768	3,139,631	152,774	2,064,648
Indicator Microorganism ^a	Synergism coefficient ^c						
	EntL50A	EntL50B	EntJS	EntL50A + EntL50B	EntL50A + EntJS	EntL50B + EntJS	EntL50A + EntL50B + EntJS
<i>L. monocytogenes</i> CECT4032	-	-	-	2.0	0.6	-	1.3
<i>E. faecium</i> P13	-	-	-	8.0	6.0	-	-
<i>P. acidilactici</i> 347	-	-	-	4.4	6.3	0.2	2.9
<i>Lb. buchnerii</i> CECT4674	-	-	-	23.7	18.2	0.3	3.6
<i>P. damnosus</i> CECT4797	-	-	-	2.8	2.5	0.4	1.2
<i>P. damnosus</i> CECT4694	-	-	-	3.9	1.6	0.1	0.9

^a *Enterococcus faecium* P13 and *Pediococcus acidilactici* 347 were from the DNBTA (Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain). *Listeria monocytogenes* 4032, *Lactobacillus buchneri* 4674, *Pediococcus damnosus* 4797 and *P. damnosus* 4694 were from the CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain).

^b Antimicrobial activity as determined by the MPA. BU, bacteriocin units.

^c For synergism assays samples of separately *in vitro*-synthesized EntL50A, EntL50B and EntJS were mixed in a 1:1 ratio. The synergism coefficient is the ratio calculated dividing the antimicrobial activity of the mixed *in-vitro* synthesized peptides by the sum of the antimicrobial activity of the individual peptides.

(-) No antimicrobial activity or synergistic effects detected.

Table 3. Production and antimicrobial activity of EntJS from supernatants of *P. pastoris* X-33JS grown in the complex medium BMMY

Incubation time (h)	OD ₆₀₀ ^a	EntJS production (ng/mg cell dry weight) ^b	Antimicrobial activity (mm ² /mg cell dry weight) ^c	Specific antimicrobial activity (mm ² /ng EntJS) ^d
0	1.0	NP	NA	NE
4	2.1	NP	NA	NE
8	3.2	4.7	NA	NE
12	3.6	5.0	NA	NE
24	5.3	5.3	47.1	8.8
48	6.9	8.3	57.8	6.9
74	7.4	14.5	60.0	4.1
105	7.7	14.1	80.7	5.7
125	8.8	13.2	120.6	9.1
144	8.9	13.4	147.5	11.0
192	9.7	12.8	211.5	16.5

^a Optical density of the culture at 600 nm.

^b Bacteriocin production determined by a NCI-ELISA using specific polyclonal antibodies against EntL50B.

^c Antimicrobial activity determined by an ADT against *P. damnosus* 4694 and expressed in square millimeters per milligram of cell dry weight.

^d Specific antimicrobial activity refers to the antimicrobial activity against *P. damnosus* 4694 divided by the EntJS produced.

NP, no production. NA, no activity. NE, not evaluable.

Table 4. Purification of the antimicrobial activity of *P. pastoris* X-33JS

Purification stage	Volume (ml)	Total A_{254} ^a	Total activity (BU) ^b	Specific activity (BU/ A_{254}) ^c	Increase in specific activity (fold) ^d	Yield (%)
Culture supernatant	400	1,720	20,600	12	1	100
Ammonium sulphate precipitate	40	48	9,955	207	17	48
Gel filtration chromatography	80	24.80	5,743	231	19	27
Cation-exchange chromatography	50	4.45	5,789	1,300	108	28
Hydrophobic interaction chromatography	10	0.62	4,992	8,051	670	24
Reverse phase chromatography	0.6	0.0024	761	317,041	26,420	3

^a Absorbance at 254 nm multiplied by the volume in milliliters.

^b Antimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml) multiplied by the total volume.

^c Specific activity is the number of bacteriocin units divided by the total A_{254} .

^d The specific activity of a fraction divided by the specific activity of the culture supernatant.

Table 5. Production of EntL50A and EntL50B and antimicrobial activity of the supernatants from *E. faecium* L50 and *E. faecalis* DBH18

Strain	EntL50A production (ng/mg cell dry weight) ^a	EntL50B production (ng/mg cell dry weight) ^b	Antimicrobial activity (BU/mg cell dry weight) ^c
<i>E. faecium</i> L50	64	68	19,200
<i>E. faecalis</i> DBH18	28	470	52,125

^a Bacteriocin production determined by a NCI-ELISA using specific polyclonal antibodies against EntL50A.

^b Bacteriocin production determined by a NCI-ELISA using specific polyclonal antibodies against EntL50B.

^c Antimicrobial activity by the MPA with *P. damnosus* CECT4797 as the indicator microorganism. BU, bacteriocin units.

Table 6. Antimicrobial activity^a and inhibitory spectrum of supernatants from *E. faecalis* DBH18 and *E. faecium* L50

Indicator strain	Source ^b	Supernatants	
		<i>E. faecalis</i> DBH18	<i>E. faecium</i> L50
<i>Lb. reuteri</i> 20016	DSM	2,049	610
<i>Lb. helveticus</i> 15009	ATCC	2,255	490
<i>Lb. casei</i> 334	ATCC	4,760	2,416
<i>Lb. bulgaricus</i> 11842	ATCC	2,425	375
<i>Lb. acidophilus</i> 4356	ATCC	1,681	2,186
<i>Lb. sakei</i> 2714	NCFB	1,188	378
<i>L. lactis</i> BB24	DNBTA	987	-
<i>P. acidilactici</i> 347	DNBTA	5,740	2,980
<i>P. pentosaceus</i> FBB61	TNO	5,603	3,202
<i>E. faecium</i> P13	DNBTA	6,683	4,552
<i>E. faecium</i> L50	DNBTA	2,279	-
<i>E. faecium</i> T136	DNBTA	7,194	4,734
<i>E. faecalis</i> INIA4	INIA	4,072	3,677
<i>E. faecalis</i> P4	IFR	1,270	798
<i>E. faecalis</i> P36	IFR	1,297	2,349
<i>Propionibacterium</i> sp. P4	NCDO	1,085	2,140
<i>Propionibacterium</i> sp. P6	NCDO	865	1,586
<i>P. acidipropionici</i> 563	NCDO	792	2,045
<i>C. tyrobutiricum</i> 1754	NCDO	712	-
<i>C. perfringens</i> 376	CECT	1,586	1,188
<i>C. botulinum</i> 551	CECT	1,282	3,343
<i>L. monocytogenes</i> 911	CECT	720	3,234
<i>L. monocytogenes</i> 932	CECT	1,308	2,846
<i>L. monocytogenes</i> 935	CECT	1,180	4,264
<i>L. monocytogenes</i> 4031	CECT	882	2,911
<i>L. monocytogenes</i> 4032	CECT	1,024	3,442
<i>L. ivanovii</i> 913	CECT	902	5,114
<i>L. seeligeri</i> 917	CECT	1,743	4,143
<i>L. welshimeri</i> 919	CECT	607	2,615
<i>L. grayi</i> 931	CECT	1,206	2,615
<i>S. aureus</i> 137	FRI	487	3,316
<i>S. aureus</i> 196E	FRI	595	2,985
<i>S. aureus</i> 361	FRI	522	3,294
<i>S. aureus</i> 472	FRI	685	2,735
<i>Ps. fluorescens</i> 378	CECT	-	-
<i>Brocothrix thermosphacta</i> 847	CECT	-	-

^a Area of the halos of inhibition by the ADT and expressed in mm²/mg cell dry weight.

^b Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, USA); CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain); DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain); DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zell Kulturen (GmbH, Braunschweig, Germany); FRI, Food Research Institute (Madison, USA); IFR, Institute of Food Research (Norwich, UK); INIA, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (Madrid, Spain); NCDO, National Collection of Dairy Organisms (Reading, UK); NCFB, National Collection of Food Bacteria (Reading, UK); TNO, Nutrition and Food Research (Zeist, The Netherlands).

(-) No antimicrobial activity detected.

Figure 1

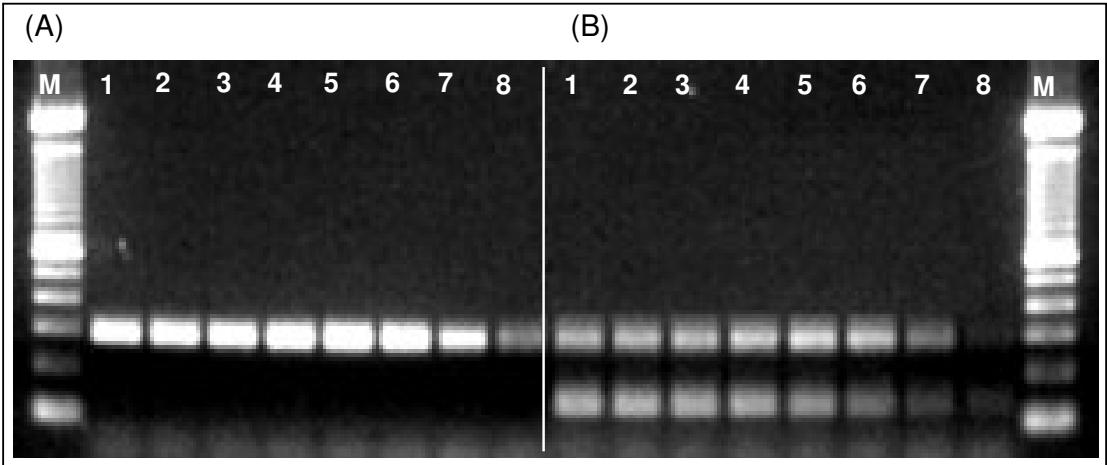


Figure 2

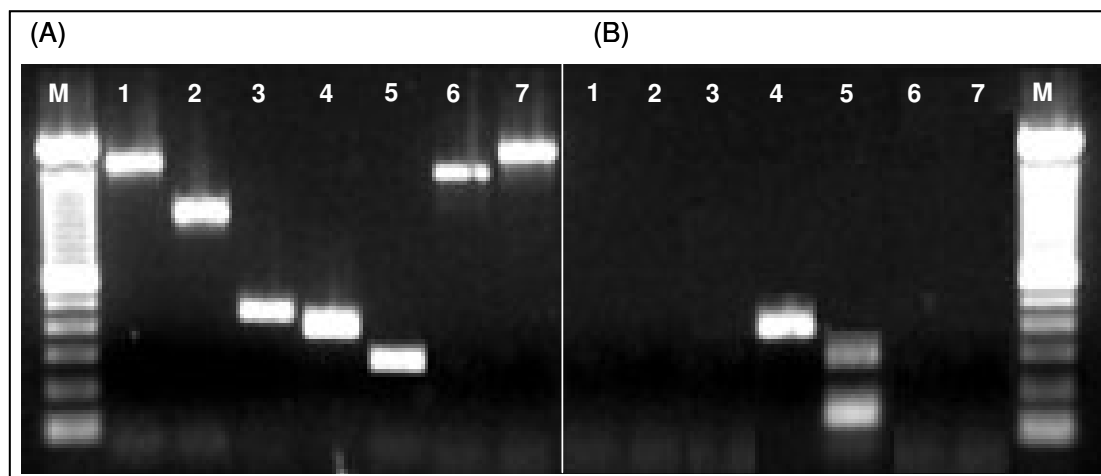


Figure 3

```
1      TATGGGAGCAATCGCAAAATTAGTAGCAAAGTTTGGATGGCCATTTATTAAAAAATTCTA
      M G A I A K L V A K F G W P F I K K F Y
entJS
61     CAAACAAATTATGCAGTTTATCGGACAAGGATGGACAATAGATCAAATTGAAAAATGGTT
      K Q I M Q F I G Q G W T I D Q I E K W L

121    AAAAAAGACATTGATTTTTATATTATATTAGATTTTGAAAAATACTATGAAATAATAAGTA
      K R H *

181    TATCCTTGTTATTTCATAGTATTTTATTTGTTAAGGAAATGTTTTAAATTATCTTATGTT

241    AATAACAAGTTTTTTTTCTACTACTGATATCGTTTGACTTAATGGTATAGGTTGTTTTAA

301    ATTAAAAACGAAAGGGGACTGTAGCAATTGTCTATTAATTATAGGAGGTAAAAATGGAAA
                        RBS          M E N
                        orfB
361    ATTATTTCTCTAATTTTAGTTTCAGAAGATCAAAATTTTATGATTGATTTTTTATTATCTG
      Y F S N F S S E D Q N F M I D F L L S E

421    AAGGTAATATATCAAAAATGTGTAAAAAGGGATATTCCTACTCAAAAGTAAAAAAAAAAGC
      G N I S K M C K K G Y S Y S K V K K K L

481    TACAATATATCAATGAAAAAATAGGTAAAGAAAGGTATTCACAAGATTCTTTAAAAGAGT
      Q Y I N E K I G K E R Y S Q D S L K E Y

541    ATTTAGATATTCTTGTTTCTGAGGATATTCTATTTCCAGAAATAGCTAAATTGATTTATA
      L D I L V S E D I L F P E I A K L I Y K

601    AAAAAACATAAGGAGATGTTATAAATGAGTTTGAATGTAATTGTGTTGTTAGCGCTATTAG
      K H K E M L * M S L N V I V L L A L L A
                        orfC
661    CTGTGCAAACGTGGCTGATACCAAGATTAAATAATAAGTTTTTATTACTAATAGTTCCAA
      V Q T W L I P R L N N K F L L L I V P S

721    GTATATTTGTTGTATTAAGTTTATATATATATAGAGAGAATTTGAGTTTATTAATAATTA
      I F V V L S L Y I Y R E N L S L L I I I

781    TAGGATTGATGTTTGGATTCTTTATTTACTATATGGCTGGATTACCTCAGTGGGATAGGG
      G L M F G F F I Y Y M A G L P Q W D R D

841    ATAAACCAAAGAGAGCCCCAAAAAATATTTAAAAGAGAAATTTTTTCAATGAAAAATGG
      K P K R A Q K K Y L K E K F F Q *

901    A
```


CAPÍTULO VII

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

GENERAL

Nota aclaratoria: a lo largo de este capítulo se muestran los resultados descritos en los capítulos III, IV, V y VI, y las conclusiones derivadas de éstos. Para ello, se hará referencia a figuras y tablas de los capítulos citados, las cuales se reseñarán con el número del capítulo de dónde proceden seguido de su número de identificación en el capítulo correspondiente.

VII.1. ASPECTOS HIGIÉNICOS, SEGURIDAD Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ENTEROCOCOS BACTERIOCINOGÉNICOS AISLADOS DE ÁNADES REALES (*Anas platyrhynchos*)

RESUMEN

Del intestino y canales de ánades reales (*Anas platyrhynchos*) se aislaron, selectivamente, enterococos que se evaluaron por su actividad antimicrobiana, por la presencia de genes que codifican bacteriocinas y su expresión, así como por la presencia de genes que codifican factores potenciales de virulencia. De los aislados del género *Enterococcus* con actividad antimicrobiana, *Enterococcus faecalis* constituyó la especie mayoritaria, seguido de *E. faecium*, *E. hirae* y *Enterococcus* spp. Aunque todos los *E. faecalis* aislados mostraron una potente actividad antimicrobiana directa, no se detectó actividad antimicrobiana en la mayoría de sus sobrenadantes. Sin embargo, todos los *E. faecium* evaluados generaban sobrenadantes con actividad antimicrobiana y codificaban bacteriocinas, aunque la presencia en los aislados de diversos genes codificantes de bacteriocinas no siempre se correlacionaba con una mayor actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes. El gen *efaAfm* fue el único determinante de virulencia identificado en *E. faecium*, mientras que los aislados de *E. faecalis* poseían un elevado número de factores de virulencia y los de *E. hirae* no mostraron ninguno de los determinantes de virulencia evaluados. Por ello, los aislados bacteriocinogénicos de *E. faecium* y *E. hirae* pueden considerarse higiénicos por su producción de enterocinas, así como potencialmente seguros debido a la baja o nula incidencia de genes que codifican factores potenciales de virulencia y a su susceptibilidad a la mayoría de los antibióticos de relevancia clínica. Sin embargo, la presencia en el intestino y canales de ánades reales de cepas de *E. faecalis* con una potente actividad antimicrobiana y múltiples factores de virulencia, acrecienta la preocupación por su posible patogenicidad para los consumidores. La amplificación por PCR de genes que codifican bacteriocinas, la utilización de técnicas inmunoenzimáticas adecuadas con anticuerpos policlonales de actividad predeterminada frente a diversas bacteriocinas (ELISA-NCI), así como la adscripción de los aislados con actividad antimicrobiana a diferentes grupos de inhibición permitió el reconocimiento de aislados potencialmente productores de nuevas bacteriocinas. De los microorganismos evaluados, *Enterococcus hirae* DCH5 y *Lactococcus garvieae* DCC43, aislados del contenido intestinal y de la canal de ánades reales respectivamente, parecían producir una sustancia(s) antimicrobiana(s) no descrita(s). La purificación de la actividad antimicrobiana de *E. hirae* DCH5 y *L. garvieae* DCC43 mediante el empleo de soportes cromatográficos diversos, reveló un único fragmento cromatográfico tras su análisis de espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS), lo que sugiere que los péptidos antimicrobianos correspondientes se purificaron a homogeneidad.

VII.1.1. IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y DETECCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN BACTERIOCINAS Y FACTORES POTENCIALES DE VIRULENCIA

La evaluación de la actividad antimicrobiana directa frente a diversos microorganismos indicadores de 500 aislados del contenido intestinal y canales de cinco ánares reales (*Anas platyrhynchos*) desarrollados en tres medios selectivos para enterococos, permitió determinar que 70 (14%) manifestaron una actividad antimicrobiana directa, cuantificable y clasificable en veinte grupos de inhibición (del I al XX) (Tabla III.1). De los aislados con actividad antimicrobiana se seleccionaron un total de 31 representativos de cada uno de los 20 grupos de inhibición (2 aislados del grupo I, 6 aislados del grupo II, 2 aislados de los grupos III, IV, IX, XIV y XV, y un aislado de cada uno de los grupos restantes) para su identificación a nivel de género y especie, y para la evaluación de la presencia de genes que codifican bacteriocinas ya descritas y factores potenciales de virulencia. Se determinó (Tabla III.2) que todos los aislados excepto uno (DCC43, grupo XVIII) amplificaron por PCR un fragmento de 112-pb que permitía su adscripción al género *Enterococcus*. Dichos aislados fueron posteriormente evaluados por técnicas genéticas de PCR para determinar la especie a la que pertenecen, de tal manera que aquellos que generaron por PCR un fragmento de 550-pb fueron adscritos a la especie *E. faecium*, mientras que los que amplificaron un fragmento de 941-pb se adscribieron a la especie *E. faecalis*. Sin embargo, los enterococos de los grupos de actividad VIII y XIV no pudieron asignarse a ninguna de las especies de enterococos evaluadas, por lo que se consideró necesario para su correcta identificación, así como la del aislado DCC43, el análisis y comparación de sus perfiles de proteínas totales mediante técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). De este modo, los aislados *Enterococcus* sp. DCH5 y *Enterococcus* sp. DCH6 se identificaron como *E. hirae*, mientras que el aislado DCC43 se identificó como *Lactococcus garvieae*, lo que confirma la baja selectividad de los medios empleados para seleccionar el desarrollo de los enterococos (Domig y col., 2003). Por tanto, los aislados de *E. faecalis* constituyeron la especie más aislada del género *Enterococcus* con actividad antimicrobiana (48%), seguidos de *E. faecium* (39%), *E. hirae* (6%), *L. garvieae* (3%) y un aislado enterocócico aún no identificado (3%) (Fig. 7.1).

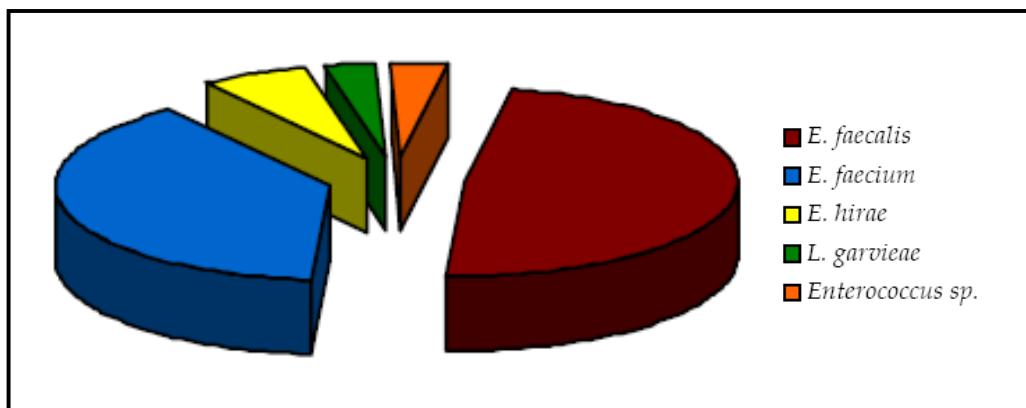


Fig. 7.1. Proporción de especies identificadas del género *Enterococcus*. El gráfico refleja la proporción de especies del género *Enterococcus* identificadas tras la identificación de los 31 aislados representativos de cada uno de los 20 grupos de inhibición establecidos.

Cuando se comparan los resultados obtenidos con los de otros investigadores se observa que *E. cecorum* también se considera como componente de la flora microbiana del ánade real (Murphy et al., 2005), mientras que *L. garvieae* se ha aislado de numerosas especies de peces y contribuye a la ecología microbiana de determinados productos cárnicos (Rantsiou y col., 2005). No obstante, en un trabajo previo similar con palomas torcaces (*Columba palumbus*), se determinó la existencia de un mayor porcentaje de enterococos aislados con actividad antimicrobiana y el predominio de *E. faecium* como la especie mayoritaria con actividad antimicrobiana (Martín y col., 2006).

Posteriormente, el ADN purificado de los enterococos con actividad antimicrobiana seleccionados se amplificó por PCR con cebadores específicos para determinar la posible presencia de genes estructurales que codifican bacteriocinas ya descritas (Tabla VII.1). Ello permitió evaluar la presencia en los aislados de interés de los genes estructurales de la enterocina A (*entA*) (Aymerich y col., 1996), enterocina B (*entB*) (Casaus y col., 1997), enterocina P (*entP*) (Cintas y col., 1997), enterocina L50 (*entL50A* y *entL50B*) (Cintas y col., 1998), enterocina Q (*entQ*) (Cintas y col., 2000), mundticina KS (*munKS*) (Kawamoto y col., 2002), enterocina AS-48 (*as-48*) (Martínez-Bueno y col., 1994), bacteriocina 31 (*bac31*) (Tomita y col., 1996), enterocinas 1071A y 1071B (*ent1071A-ent1071B*) (Balla y col., 2000), enterolisina A (*enlA*) (Hickey y col., 2003b; Nilsen y col., 2003), y el precursor de la citolisina (*cylL_L-cylL_S*) (Gilmore y col., 1994), si bien, la presencia de los genes estructurales de otras enterocinas como la enterocina SEK4 (Eguchi y col., 2001), enterocina RJ-11 (Yamamoto y col., 2003) y enterocina EJ97 (Sánchez-Hidalgo y col., 2003) no se ha evaluado en este trabajo.

Tabla VII.1. Cebadores específicos para la detección por PCR de genes estructurales de diversas enterocinas

Primer	Sequence (5' to 3')	Fragment size (bp)	Target gene
TH10	f : GATTATGAAACATTTAAAAATTTTGTC	172	<i>entA</i>
LA1	r : AAAACCACTTATAGACATTCCTGC		
EntB3	f : AGACCTAACAACCTTATCTAAAG	126	<i>entB</i>
EntB5	r : GTTGCACTTAGAGTATACATTTGC		
EntP1	f : ATGAGAAAAAATTATTTAGTTTAGCTCTTATTGG	216	<i>entP</i>
EntP2	r : TTAATGTCCCATACCTGCCAAACCAG		
EntL50-R1	f : ATGGGACGAATCGCAAAATTAGTAGC	286	<i>entL50A-entL50B</i>
EntL50-R2	r : TTAATGTCTTTTAGCCATTTTCATTTTGATC		
EntQ-R1	f : ATGAATTTTCTTCTTAAAAATGGTATCGCAAAATG	105	<i>entQ</i>
EntQ-R2	r : TTAACAAGAAATTTTTCCTATGGCAA		
ORF3-F	f : TTGTTCAAAAAATGAAGGAATCAAGGAGGA	800	<i>munKS</i>
ORF2-R	r : AAATGAATTCTTCATCAGAATGAATGGGAG		
CYLL _L -R1	f : GTGTTGAGGAAATGGAAGCG	324	<i>cylL_L-cylL_S</i>
CYLL _S -R5	r : TCTCAGCTGAACATCTCCAC		
AS48-R1	f : TCGGTATACCAGCAGCAGTT	125	<i>as-48</i>
AS48-R2	r : TCGTCAGCGAGTAAGAAA		
Bac31-R1	f : TGGCATTATTGGGATTGTT	132	<i>bac31</i>
Bac31-R2	r : TTTCCAATTTCCCTTGAAGC		
Ent1071AB-R1	f : GGGGGAGAGTCGGTTTTTAG	273	<i>ent1071A-ent1071B</i>
Ent1071AB-R2	r : ATCATATGCGGGTTGTAGCC		
PCELF	f : CGATTTCTGTTGTAGGAACC	1,770	<i>enlA</i>
PCELR	r : GTACATCTCCATATACTTTTCC		

Fuente: Martín y col. 2006.

Los resultados obtenidos mostraron que todos los aislados de *E. faecium* manifestaron actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes y amplificaban algunos de los siguientes fragmentos génicos (Tabla III.2): el fragmento de 216-pb del gen *entP*, el de 172-pb de *entA*, el

de 126-pb de *entB*, el de 286-pb de los genes que codifican la enterocina L50 (*entL50A-entL50B*) o el fragmento de 105-pb de *entqA*, observándose además que la mayoría de ellos codificaba el gen estructural de varias de estas bacteriocinas. Igualmente, se observó que entre los aislados de *E. faecium*, 1 (8%, perteneciente al grupo VI) mostraba el gen *entP*, 4 (33%, pertenecientes a los grupos I, II y XIX) portaban los genes *entA* y *entB*, 1 (8%, perteneciente al grupo V) presentaba los genes *entP*, *entA* y *entB*, 3 (25%, de los grupos III y XV) portaban los genes *entP*, *entL50A-entL50B* y *entqA*, 1 (8%, del grupo XVI) poseía los genes *entP*, *entL50A-entL50B* y *entA*, 1 (8%, del grupo I) mostraba los genes *entP*, *entL50A-entL50B*, *entA* y *entB*, y 1 (8%, perteneciente al grupo XV) portaba los genes *entP* y *entL50A-entL50B*. Sin embargo, entre los aislados de *E. faecalis*, sólo los aislados DBH18 y DBH20 (13%, pertenecientes al grupo II) mostraban actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes, portando además el gen *entL50A-entL50B*, mientras que 7 (46%, de los grupos IV, IX, X, XI, XII y XX) poseían el gen *entA*, y 6 (40%, de los grupos II, VII, IX, XIII y XVII) no amplificaron ningún fragmento génico del tamaño de las bacteriocinas evaluadas. Además, ninguno de los aislados evaluados amplificaron fragmentos génicos correspondientes a los genes *cylLL-cylLS*, *as-48*, *munKS* y *ent1071A-ent1071B*, mientras que los aislados *E. hirae* DCH5, *E. hirae* DCH6, *Enterococcus* sp. DAC37 y *L. garvieae* DCC43 no amplificaron ningún fragmento. De los resultados obtenidos se desprende que parece no existir una correlación directa entre la presencia de genes que codifican bacteriocinas descritas y el espectro antimicrobiano de los aislados, a pesar de que se ha descrito una correlación directa entre ambos parámetros en enterococos aislados de otros ecosistemas (Martín y col., 2006). No obstante, la presencia de los genes *entA*, *entB*, *entP*, *entL50A-entL50B* y *entqA*, solos o en combinación con otros, parece ser común en enterococos de origen humano, animal, clínico, alimentario, agrícola o ambiental (Herranz y col., 1999; Cintas y col., 2000; De Vuyst y col., 2003; Foulquié-Moreno y col., 2003; Ben Omar y col., 2004; Martín y col., 2006).

Los enterococos seleccionados se evaluaron también para determinar la posible presencia de factores potenciales de virulencia. Así, se analizó la presencia de genes que codifican los precursores de una citolisina/bacteriocina (*cylLL-cylLS*), una proteína de agregación (*agg*), una metaloendopeptidasa extracelular (*gelE*), una proteína asociada a la pared celular (*esp*), adhesinas de la pared celular expresadas por *E. faecalis* (*efaAfs*) y *E. faecium* (*efaAfm*) y feromonas sexuales (genes *cpd*, *cob* y *ccf*). Los aislados identificados como *E. faecium* amplificaron únicamente el fragmento de 735-pb del gen *efaAfm*, mientras que todos los aislados de *E. faecalis* amplificaron el fragmento de 705-pb del gen *efaAfs*, el fragmento de 419-pb del gen *gelE* y los fragmentos de 782-pb y 543-pb correspondientes a los genes que codifican las feromonas sexuales *cpd* y *ccf* respectivamente. Además, todos los aislados de *E. faecalis* excepto tres, también amplificaron el fragmento de 1405-pb del gen *cob* que codifica otra feromona sexual. Sin embargo, únicamente *E. faecalis* DCH9 y *E. faecalis* DAC10 amplificaron el fragmento de 1553-pb del gen *agg*, mientras que *E. faecalis* DBC4 fue el único en amplificar el fragmento de 933-pb del gen *esp*, el fragmento de 742-pb del gen *cylM* y el fragmento de 701-pb del gen *CylA* (Fig. III.1), siendo el aislado con más genes codificantes de factores potenciales de virulencia. Por otra parte, todos los aislados de *E. faecalis* fueron fenotípicamente hemolisina y gelatinasa positivos, al contrario que los aislados de *E. faecium* que resultaron negativos frente a ambas pruebas. Cabe destacar que los aislados *E. hirae* DCH5, *E. hirae* DCH6, *Enterococcus* sp. DAC37 y *L. garvieae* DCC43 no amplificaron ningún fragmento del tamaño de los factores potenciales de virulencia evaluados.

El hecho de que ningún aislado de *E. faecium* mostrase factores potenciales de virulencia, exceptuando el gen de la adhesina de la pared celular *efaAfm*, coincide con los resultados de otros investigadores (Eaton y Gasson, 2001; Martín y col., 2006), lo que sugiere la escasa virulencia de los enterococos de esta especie y su posible seguridad en la industria alimentaria. Sin embargo, la ausencia de genes que codifican feromonas sexuales en las cepas de *E. faecium* evaluadas puede deberse más a divergencias en la secuencia nucleotídica de los genes evaluados que a su ausencia en los mismos. De hecho, el intercambio de información genética inducido por feromonas entre *E. faecalis* y *E. faecium*, se ha descrito ya por algunos investigadores (Eaton y Gasson, 2001).

Contrariamente a lo que sucede con los aislados de *E. faecium*, la incidencia de factores potenciales de virulencia en las cepas de *E. faecalis* evaluadas es mayor, con la presencia en todas ellas los genes *efaAfs*, *cpd*, *ccf* y *gelE*, y el gen *cob* en la mayoría de los casos. La producción de feromonas sexuales por *E. faecalis* no es conveniente ya que promueven la adquisición de resistencias a antibióticos y otros factores de virulencia de otros enterococos, contribuyendo así a un incremento de su patogenicidad (Eaton y Gasson, 2001). Por otro lado, la ausencia de un fragmento completo del operón *cylMBA* en las cepas de *E. faecalis* evaluadas puede indicar la ausencia de una verdadera β -hemólisis o que la hemólisis observada se deba a un mecanismo molecular aún desconocido. Otros investigadores han descrito la presencia del operón *cylMBA* en cepas de *E. faecalis* no hemolíticos (Eaton y Gasson, 2001) y una mayor incidencia de enterococos hemolíticos con los genes *cyl_{LL}*-*cyl_{LS}* (De Vuyst y col., 2003; Semedo y col., 2003b). Fenómenos de inserción o delección pueden dar como resultado el truncado o la ausencia de genes *cyl*, así como posibles divergencias en la secuencia de las subunidades estructurales de la citolisina, lo que explicaría las dificultades para abordar el estudio de los genes involucrados en la producción de citolisinas activas (Semedo y col., 2003b; Pillar y Gilmore, 2004). Únicamente la cepa de *E. faecalis* DBC4 presentaba el gen *esp*, lo que contrasta con otros estudios en los que entre el 33 y el 36% de los *E. faecalis* aislados de alimentos producen la proteína asociada a la pared celular Esp (Eaton y Gasson, 2001; Franz y col., 2001). La ausencia de *esp* es, en cualquier caso, una ausencia positiva para los *E. faecalis* aislados de alimentos.

Las cepas de *E. faecalis* evaluadas en este trabajo poseen un mayor número de determinantes de virulencia que las de *E. faecium*, lo que puede favorecer la persistencia de enterococos potencialmente patógenos en el contenido intestinal y canales de las ánades reales y la transmisión de los genes que codifican dichos factores potenciales de virulencia a otros enterococos. Sin embargo, no debería descartarse la posibilidad de que la ausencia de factores potenciales de virulencia en los enterococos evaluados se deba más a la posible existencia de secuencias nucleotídicas diferentes que a la ausencia de genes que codifican factores potenciales de virulencia en los enterococos analizados. Otro factor que contribuye a la peligrosidad y patogenicidad de los enterococos es su resistencia a una gran variedad de antibióticos. Los resultados de los antibiogramas realizados en este estudio mostraron que todos los *E. faecium* y *E. faecalis* evaluados fueron resistentes al ácido nalidíxico y la estreptomina, mientras que la mayor parte lo fueron también frente a la kanamicina y la clindamicina. Se observaron, además, resistencias frente a la ciprofloxacina, eritromicina y tetraciclina en determinadas cepas de *E. faecium*, y frente a la rifampicina y la gentamicina en muchos de los aislados de *E. faecalis*. El único aislado que mostró resistencia al cloranfenicol fue *E. faecium*

DDC28. Sin embargo, todos los aislados evaluados fueron susceptibles a la penicilina G, ampicilina, vancomicina, teicoplanina, ácido fúcsídico, norfloxacin, nitrofurantoina y cloranfenicol (exceptuando la cepa de *E. faecium* DDC28, resistente a este último), resultando por tanto la mayoría de los aislados susceptibles a la mayoría de los antibióticos de relevancia clínica.

VII.1.2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN LOS AISLADOS DE *E. faecium*

También se ha evaluado la producción y expresión funcional de bacteriocinas de los aislados seleccionados mediante técnicas inmunoenzimáticas adecuadas (ELISA-NCI) con anticuerpos policlonales de actividad predeterminada frente a diversas bacteriocinas (Tabla III.3). Los resultados obtenidos mostraron que *E. faecium* DCH2 producía escasa EntP, no producía EntL50A ni EntL50B, y produjo un 82% de EntA respecto a la producción de la cepa control *E. faecium* T136. Algo similar ocurrió con *E. faecium* DCC14, que poseía los mismos genes estructurales que *E. faecium* DCH2 y cuya producción de EntP fue aún menor, siendo nula la producción de EntL50A, EntL50B y EntA, mientras su actividad antimicrobiana constituía entre un 1,7 y un 2,2% de la actividad antimicrobiana de las cepas control *E. faecium* L50 y *E. faecium* T136. De los resultados obtenidos se deduce que los genes estructurales *entL50A-entL50B* en ambas cepas y el gen *entA* en *E. faecium* DCC14 son genes silentes para la producción de dichas bacteriocinas. Aunque la secuenciación nucleotídica de los fragmentos génicos de interés no reveló diferencias polimórficas en los genes *entL50A-entL50B* y *entA*, experiencias de PCR anidados (Fig. III.2) sugirieron que *E. faecium* DCH2 posiblemente no contenía los marcos abiertos de lectura (ORF) contiguos (*orfE*, *orfF* y *orfG*) presumiblemente involucrados en el procesamiento y secreción de la EntL50 (Cintas y col., 1998). En cuanto a la baja producción de EntP por las cepas de *E. faecium* DCH2 y *E. faecium* DCC14 comparada con las de las cepas control *E. faecium* P13 y *E. faecium* L50, ésta puede ser achacada a la ausencia de un fragmento de 423-pb correspondiente a la región *entP-orf2*, lo que sugiere que modificaciones genéticas en la región del promotor de *entP* pueden afectar a su transcripción, mientras que si afectan al gen *orf2* puede afectar a la inmunidad y el transporte de EntP. De hecho, diferentes niveles de expresión de bacteriocinas se han atribuido a modificaciones en la actividad del promotor, lo que parece habitual en las BAL (Martín y col., 2006).

Los aislados *E. faecium* DCH39, *E. faecium* DEC7, *E. faecium* DEC8 y *E. faecium* DDC28 produjeron entre un 72 y un 94% de EntA respecto a la producción de la cepa control *E. faecium* T136, aunque la actividad antimicrobiana de los aislados DEC7, DEC8 y DDC28 fue de un 25 a un 45% superior respecto a la citada cepa control, mientras que la del aislado DCH39 fue similar. La mayor actividad antimicrobiana de *E. faecium* DEC7, *E. faecium* DEC8 y *E. faecium* DDC28, menores productores de EntA que *E. faecium* T136, sugiere que son productores de una EntA más estable u otras bacteriocinas todavía no descritas. Los resultados del ELISA-NCI confirmaron la producción de EntP y EntA por *E. faecium* DAC2, la primera en cantidades inferiores a las de la cepa control *E. faecium* P13 y la segunda en cantidades similares a las de la cepa *E. faecium* T136. Por su parte, la cepa de *E. faecium* DAC7 producía un 14% de EntP respecto la cepa control *E. faecium* P13 y, sin embargo, mostraba una actividad antimicrobiana del 6% respecto a la misma cepa. La co-producción de EntA y EntP en *E. faecium* DAC2 da lugar, como era de esperar, a sobrenadantes con una mayor actividad antimicrobiana que la de

las cepas control *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136, mientras que la escasa producción de EntP por *E. faecium* DAC7 podría indicar, una vez más, la existencia de diferencias fenotípicas y genéticas entre los enterococos que afectan a la producción de sus bacteriocinas.

Cuando la producción de EntP, EntL50 y EntQ se cuantificó en los sobrenadantes de las cepas de *E. faecium* DCH1, *E. faecium* DCH3 y *E. faecium* DCH37, se observó que la producción de EntP en todos ellos fue similar a la de *E. faecium* L50, mientras que la producción de las enterocinas L50 representó entre un 42 y un 67% de la producción de EntL50A, y entre un 48 y un 81% de la producción de EntL50B respecto a *E. faecium* L50, con mayores fluctuaciones en la producción de EntQ. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de sus sobrenadantes constituyó tan sólo entre el 17 y el 22% de la actividad antimicrobiana de *E. faecium* L50. Todos los aislados evaluados portadores de los genes *entP*, *entL50A-entL50B*, y *entqA* produjeron dichas enterocinas a concentraciones similares a las de la cepa de referencia *E. faecium* L50. Las diferencias observadas entre la producción de bacteriocinas y su actividad antimicrobiana en las cepas mencionadas pueden atribuirse a la producción múltiple de bacteriocinas, a la diversidad fenotípica y genética de las propias cepas bacteriocinogénicas y a factores todavía desconocidos (Gutiérrez y col., 2004; Martín y col., 2006). No obstante, en la cepa de *E. faecium* DCH38 se detectó una menor producción de EntP y una mayor producción de EntL50 que en *E. faecium* L50, no produciendo la EntQ, lo que confirma los resultados anteriores acerca de la ausencia del gen *entqA* en dicha cepa. En cualquier caso, la actividad antimicrobiana de *E. faecium* DCH38 representó un 66% de la actividad antimicrobiana de *E. faecium* L50.

La presencia de varios genes estructurales responsables de la producción de enterocinas en las cepas de *E. faecium* evaluadas no siempre se correlaciona con una mayor actividad antimicrobiana de sus sobrenadantes. Sin embargo, la rápida detección de la ausencia de genes codificantes de bacteriocinas ya descritas permite la identificación de aislados potencialmente productores de nuevas bacteriocinas. De relevancia en este trabajo ha sido la observación de que la mayoría de los *E. faecalis*, exceptuando *E. faecalis* DBH18 y *E. faecalis* DBH20, mostraron una potente actividad antimicrobiana directa con ausencia de actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes libres de células. Aunque la actividad antagonista de los *E. faecalis* productores de EnIA se detecta únicamente en medio sólido (Nilsen y col., 2003) y las células de *E. faecalis* expresan la citolisina por un mecanismo “quorum-sensing” en respuesta a la presencia de células diana (Coburn y col., 2004), estudios posteriores deberían esclarecer con mayor profundidad la actividad antimicrobiana y hemolítica de las cepas de *E. faecalis* aisladas de ánades reales. La asociación entre la producción de sustancias antimicrobianas y la de otros factores de virulencia puede contribuir a la supervivencia y mayor competitividad de los *E. faecalis* virulentos en los alimentos y el tracto gastrointestinal.

VII.1.3. SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA DE LOS GENES QUE CODIFICAN BACTERIOCINAS

Para determinar si las diferencias halladas en la producción de bacteriocinas y la actividad antimicrobiana de los enterococos evaluados respecto a las cepas de referencia podrían atribuirse a diferencias genéticas en el gen estructural de la bacteriocina o en sus proximidades, se realizaron experiencias de PCR-anidado con cebadores que permitieron la amplificación por

PCR del gen estructural que codifica las bacteriocinas EntP, EntA y EntL50 (EntL50A y EntL50B) y sus genes adyacentes, y la subsiguiente secuenciación nucleotídica de los fragmentos generados. Las amplificaciones por PCR del ADN purificado de los *E. faecium* productores de EntP con los cebadores EntP-F/EntP-R, generaron, en todos los casos excepto en *E. faecium* DCH2, un fragmento de 423-pb cuya secuencia nucleotídica resultó idéntica a la del mismo fragmento nucleotídico de la cepa de referencia *E. faecium* P13. De manera similar, amplificaciones por PCR del ADN purificado de *E. faecium* DCH2 y *E. faecium* DCC14 con los cebadores L50J40-F/L50J40-R, generaron un fragmento de 400-pb idéntico al de los genes *entL50A-entL50B* de *E. faecium* L50. Sin embargo, los resultados de un PCR anidado para determinar la localización de los genes *entL50A-entL50B* de *E. faecium* DCH2 respecto a los de *E. faecium* L50 (Fig. III.2), determinaron la ausencia de fragmentos correspondientes a los tres ORFs (*orfE*, *orfF*, *orfG*) localizados por encima del codon de iniciación de *entL50A*, mientras que una débil señal de amplificación sugirió la existencia de los dos ORFs (*orfC*, *orfD*) situados por debajo de *entL50B*. En cambio, en *E. faecium* DCC14, todos los fragmentos nucleotídicos parecían estar localizados en un fragmento génico idéntico al de *E. faecium* L50.

Las amplificaciones por PCR del ADN purificado de las cepas de *E. faecium* productores de EntA con los cebadores EntA-F/EntA-R generaron, en todos los casos, un fragmento de 380-pb cuya secuencia nucleotídica resultó idéntica a la del mismo fragmento nucleotídico de la cepa de referencia *E. faecium* T136. Asimismo, amplificaciones por PCR del ADN purificado de los *E. faecium* productores de EntP, EntL50 y EntQ con los cebadores EntP-F/EntP-R y L50J45-R/L50J45J-R generaron en todos los casos un fragmento de 423-pb correspondiente a los genes *entP-orf2* de la cepa de referencia *E. faecium* P13, y un fragmento de 450-pb que abarca los genes *entL50A-entL50B* de *E. faecium* L50. En todos los casos, la secuencia nucleotídica de los fragmentos generados de 423-pb y 450-pb fue idéntica a la obtenida de la cepa de referencia *E. faecium* L50.

VII.1.4. PURIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *E. hirae* DCH5 y *L. garvieae* DCC43

La rápida detección por métodos genéticos de los genes estructurales de bacteriocinas de interés ha facilitado la identificación de enterococos productores de bacteriocinas ya descritas y de aquellos potencialmente productores de nuevas bacteriocinas. El reducido espectro de actividad antimicrobiana del aislado *Enterococcus* sp. DAC37 descartó continuar con la purificación de su actividad antimicrobiana, lo que no ocurrió con los aislados *E. hirae* DCH5 y *L. garvieae* DCC43, que mostraron un espectro de actividad antimicrobiana mayor y no parecían portar ninguno de los genes estructurales de las bacteriocinas evaluadas. La purificación de la actividad antimicrobiana de *E. hirae* DCH5 (perteneciente al grupo XIV) permitió la obtención de una única fracción cromatográfica con un incremento de su actividad antimicrobiana específica de 133.259 veces y una recuperación de su actividad antimicrobiana inicial del 13% (Tabla III.4). El análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS) de la fracción purificada (Fig. III.3A) mostró un pico mayoritario de 5.093,2 Da, lo que sugiere que el péptido resultante se ha purificado a homogeneidad. De modo similar, la purificación de la actividad antimicrobiana de *L. garvieae* DCC43 (grupo XVIII) permitió obtener una única fracción cromatográfica con un incremento de su actividad antimicrobiana específica de 4.099.378 veces y una recuperación de su actividad antimicrobiana inicial del 209% (Tabla III.5). El análisis por espectrometría de masas

(MALDI-TOF-MS) de la fracción purificada (Fig. III.3B) mostró un pico mayoritario de 6.022 Da sugiriendo, igualmente, que el péptido eluído fue purificado a homogeneidad. El protocolo de purificación descrito en este trabajo ha permitido la purificación a homogeneidad de muchas bacteriocinas (Aymerich y col., 1996; Cintas y col., 2000; Gutiérrez y col., 2004), aunque no resultó adecuado para la purificación de el/los compuesto(s) antimicrobiano(s) de *E. columbae* PLCH2 (Martín y col., 2006). De la especie *E. hirae* se ha descrito la producción de una bacteriocina no purificada a homogeneidad, designada hiraecina S, por *E. hirae* C311 aislado de heces bovinas (Siragusa, 1992). Igualmente, se ha descrito con anterioridad que *L. garvieae* L1-5, aislado de leche bovina (Villani y col., 2001), produce la garviecina L1-5, bacteriocina de una masa molecular de aproximadamente 2,5 kDa.

VII.1.5. ASPECTOS FUNCIONALES Y DE SEGURIDAD DE LOS ENTEROCOCOS AISLADOS DE ÁNADES REALES

Los resultados de este trabajo sugieren que los ánades reales (*Anas platyrhynchos*) poseen tanto en la canal como en su contenido intestinal una variada población de enterococos con actividad antimicrobiana, mediada por péptidos antimicrobianos o enterocinas previamente descritos o en evaluación, así como por compuestos de naturaleza todavía desconocida. Los aislados bacteriocinogénicos de *E. faecium* y *E. hirae* pueden considerarse higiénicos debido a la producción de enterocinas, y potencialmente seguros por la escasa incidencia de genes que codifican factores potenciales de virulencia, así como por su susceptibilidad a la mayoría de los antibióticos de relevancia clínica. Sin embargo, la existencia entre los enterococos evaluados de cepas de *E. faecalis* con una potente actividad antimicrobiana directa y múltiples determinantes de virulencia, hace que aumente la preocupación en relación a su potencial patógeno, especialmente en personas inmunodeprimidas. En este contexto, es también sabido que elementos genéticos móviles que codifican factores potenciales de virulencia se transfieren entre enterococos de los alimentos (Cocconcelli y col., 2003) y participan en mecanismos de comunicación molecular entre la microflora animal y humana (Saavedra y col., 2003), lo que confiere a los enterococos una nueva dimensión respecto a su potencial patogenicidad como microorganismos oportunistas en personas inmunodeprimidas o con enfermedades subyacentes. Por ello, debería lograrse que los consumidores no accediesen a alimentos con elevados niveles de enterococos portadores de factores de virulencia (Martín y col., 2006). Consecuentemente, desde un punto de vista higiénico y de seguridad alimentaria, debería recomendarse la pronta evisceración y desplumado de los ánades reales y de las piezas de caza menor abatidas. En cualquier caso, los enterococos con actividad antimicrobiana evaluados en este estudio podrían encontrar aplicaciones en la industria alimentaria como productores de péptidos antimicrobianos naturales, en la producción de ingredientes alimentarios con actividad antimicrobiana, o para su empleo como cultivos iniciadores, protectores o probióticos, siempre que sus características higiénicas y de seguridad se evalúen con mayor profundidad. Igualmente, una alternativa adecuada para el uso en la industria alimentaria de las enterocinas sintetizadas por enterococos con factores potenciales de virulencia es su producción heteróloga y expresión funcional en otras bacterias lácticas, reconocidas como “seguras” (GRAS) para su empleo en los alimentos.

VII.2. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA Y NUCLEOTÍDICA DE LA HIRACINA JM79, UNA BACTERIOCINA SEC-DEPENDIENTE PRODUCIDA POR *Enterococcus hirae* DCH5

RESUMEN

La estructura primaria de una bacteriocina producida por *E. hirae* DCH5, aislado de ánades reales (*A. platyrhynchos*), se determinó mediante su secuenciación aminoacídica y nucleotídica. La determinación, mediante degradación de Edman, de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina purificada a homogeneidad proporcionó una secuencia aminoacídica inicial de 42 aminoácidos. El análisis nucleotídico de un fragmento de 2.838-pb reveló la presencia de cinco marcos de lectura abiertos (ORFs). El primero de ellos (*hirJM79*) codifica un péptido de 74 aminoácidos, compuesto por un péptido señal de 30 aminoácidos en su región N-terminal, seguido de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina madura, la hiracina JM79 (HirJM79), de 44 aminoácidos. El segundo *orf* (*hiriJM79*) codifica la proteína de inmunidad de HirJM79. Los ORFs posteriores codifican una hipotética proteína de movilización (*orfC*), una relaxasa/nucleasa de movilización (*orfD*), y una proteína hipotética (*orfE*), ésta última de secuencia incompleta. La producción heteróloga y expresión funcional de HirJM79 en otras BAL sugieren que el gen *hirJM79* es el requerimiento mínimo para la producción de HirJM79 biológicamente activa, que la HirJM79 es probablemente secretada por la ruta general de secreción o sistema sec-dependiente, y que la HiriJM79 es, efectivamente, la proteína de inmunidad de la HirJM79.

VII.2.1. ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR *E. hirae*

La actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células de *E. hirae* DCH5, así como de su bacteriocina purificada a homogeneidad, fue evaluada frente a diferentes microorganismos indicadores. En ambos casos la mayoría de ellos resultó sensible a su actividad antimicrobiana, aunque la actividad antagonista de la bacteriocina purificada fue mayor, al igual que el número de microorganismos indicadores sensibles (Tabla IV.1). El incremento de la actividad antimicrobiana de la HirJM79 durante su purificación puede deberse a la reducción o eliminación de inhibidores, a la disminución en la formación de agregados que reducen su actividad, o a modificaciones conformacionales hacia una forma más activa de la bacteriocina en el disolvente hidrofóbico (Gutiérrez y col., 2004). Sin embargo, ninguna de las bacterias Gram-negativas evaluadas fue sensible a la actividad antimicrobiana de *E. hirae* DCH5. No obstante, la bacteriocina producida por *E. hirae* DCH5 inhibe el desarrollo de bacterias patógenas y alterantes de los alimentos como *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

VII.2.2. SECUENCIACIÓN AMINOACÍDICA Y NUCLEOTÍDICA DE LA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR *E. hirae* DCH5

La determinación mediante degradación de Edman de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina purificada de *E. hirae* DCH5 permitió la obtención de la siguiente secuencia: AGYYGNGLYCNKEKCVDXNXAKGEIGKIIVNGXVNXGPXAP. La X en las posiciones 16, 19, 21, 34, 37 y 40 indica ciclos en blanco en los que no se detectó la presencia de un aminoácido

conocido. Después de 42 pasos, la secuencia aminoacídica obtenida no proporcionó más lectura porque la señal resultante era demasiado débil.

Una vez determinada la secuencia aminoacídica de la bacteriocina producida por *E. hirae* DCH5, se procedió al diseño de cebadores degenerados que permitiesen la determinación de su secuencia nucleotídica. Para ello, ADN purificado de *E. hirae* DCH5 se fragmentó con enzimas de restricción que se clonaron en un vector de secuenciación antes de proceder a su secuenciación nucleotídica. La secuenciación nucleotídica de fragmentos génicos procedentes de la amplificación por PCR de mezclas de reacción con cebadores degenerados diseñados de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina purificada y de los cebadores del plásmido de secuenciación, permitieron la secuenciación de un fragmento de ADN de 2.838-pb que contenía el gen de la bacteriocina producida por *E. hirae* DCH5. El análisis de la secuencia nucleotídica, cuyo número de admisión en GenBank es DQ664500, reveló la presencia de cinco marcos de lectura abiertos (ORFs) denominados *hirJM79*, *hiriJM79*, *orfC*, *orfD* y *orfE*, éste último de secuencia incompleta (Fig. IV.1). El primer *orf*, denominado *hirJM79*, codifica una proteína de 74 aminoácidos compuesta por un péptido N-terminal de 30 aminoácidos seguido de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina purificada, la hiracina JM79 (*HirJM79*), de 44 aminoácidos (Fig. IV.2). La masa molecular calculada de la *HirJM79* madura es de 5093,7 Da, prácticamente idéntica a la obtenida por MALDI-TOF-MS de la bacteriocina purificada (5093,2) (Fig. III.3.A). El codon de iniciación ATG está precedido por un posible lugar de unión al ribosoma (RBS, del inglés “*Ribosome-Binding Site*”) y por las regiones nucleotídicas típicas -10 y -35 de un promotor. En la región del promotor también se aprecian dos series de repeticiones invertidas, ricas en AT, que podrían servir como posibles lugares de unión de reguladores transcripcionales (Cintas y col., 1997). Un segundo *orf*, denominado *hiriJM79*, que codifica una proteína de 95 aminoácidos está situado 20 nucleótidos después del codon de terminación de *hirJM79*. Como en el caso anterior, el codon de iniciación ATG está precedido por un posible RBS y, probablemente, codifique la proteína de inmunidad de *HirJM79* a juzgar por su localización, inmediatamente por debajo del gen estructural *hirJM79*, algo común en los operones de las bacteriocinas de las BAL (Nes y col., 1996). El tercer *orf*, *orfC*, localizado 430-pb por debajo del codon de terminación del gen *hiriJM79*, codifica, probablemente, una proteína de 129 aminoácidos. Por su parte, el cuarto *orf*, *orfD*, situado 800-pb por debajo del codon de terminación de *hiriJM79* y solapándose con el final de *orfC*, codifica una proteína de 304 aminoácidos. El quinto *orf*, *orfE*, cuya secuencia está incompleta y situado a 1.960-pb por debajo del codon de terminación del gen *hiriJM79*, muestra un 100% de identidad con los primeros 26 aminoácidos de una proteína hipotética de 229 aminoácidos descrita en *E. faecium* DO (número de admisión en GenBank AAK03000087).

La secuencia aminoacídica, obtenida de la secuencia nucleotídica, coincide con la secuencia obtenida por degradación de Edmand, excepto por la presencia de Thr en vez de Gly en la posición 2 de la secuencia aminoacídica y por la presencia de Trp, Trp, Gln, Trp, His, y Trp en las posiciones 16, 19, 21, 34, 37 y 40 respectivamente. Además, la secuencia aminoacídica derivada de la nucleotídica muestra dos aminoácidos adicionales en su región C-terminal, concretamente dos residuos de Arg en las posiciones 43 y 44. El análisis de la secuencia aminoacídica definitiva permite observar que la hiracina JM79 madura contiene una secuencia consenso en la región N-terminal denominada “pediocin box”, característica común entre las bacteriocinas similares a las pediocinas (“pediocin-like”) y formada por los aminoácidos Tyr-Gly-Asn-Gly-Val, excepto por un residuo de Leu en vez de Val. Dicha secuencia contiene, además,

los dos residuos conservados de cisteína que se identifican siempre en las bacteriocinas de este tipo (ver apartado II.1.3.3.1). La hiracina JM79 es un péptido catiónico con un *pI* de 9,1. La extensión N-terminal de HirJM79 presenta tres aminoácidos cargados positivamente (Lys-Lys-Lys) inmediatamente después de la metionina N-terminal, una serie de aminoácidos hidrofóbicos, y dos aminoácidos pequeños e hidrofóbicos en posiciones -1 y -3 respecto al hipotético sitio de corte por peptidasas (Ala y Val respectivamente). Las características descritas son típicas de los péptidos señal de las bacteriocinas secretadas por la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente (Von Heijne, 1983; Worobo y col., 1995). Por tanto, la bacteriocina producida por *E. hirae* DCH5 probablemente se sintetice como un prepéptido que se corta a nivel de los residuos Val-Asp-Ala (posiciones de -3 a -1) liberando la HirJM79 madura. Por otra parte, cuando la secuencia aminoacídica obtenida se comparó con la de otros péptidos registrados en bases de datos informatizadas, se determinó que HirJM79 era idéntica a la bacteriocina T8 (100% de identidad; número de admisión en GenBank DQ402539) producida por *E. faecium* T8 aislado de secreciones vaginales de niñas infectadas con el VIH (De Kwaadsteniet y col., 2006). La hiracina JM79 madura también reveló una gran homología con la bacteriocina RC714, idéntica excepto por la ausencia en ésta de los últimos dos aminoácidos y producida por *E. faecium* RC714 aislado de muestras de exudados humanos (Del Campo y col., 2001). Asimismo, la HirJM79 mostró homología con las enterocinas Sec-dependientes bacteriocina 31 (69% de identidad), producida por *E. faecalis* Y1717 (Tomita y col., 1996) y con la enterocina P (47% de identidad), producida por *E. faecium* P13 (Cintas y col., 1997). De igual modo, la secuencia del péptido HiriJM79, codificado por el gen *hiriJM79*, mostró una homología del 100% con el posible péptido de inmunidad de la bacteriocina T8 (De Kwaadsteniet y col., 2006) y una identidad del 50% con el hipotético gen de inmunidad de la bacteriocina 31 (Tomita y col., 1996).

Tabla VII.2. Comparación de la secuencia aminoacídica de la hiracina JM79, bacteriocina RC714, bacteriocina 31 y bacteriocina T8

Bacteriocina ^a	Secuencia aminoacídica ^b		Cepa productora	Origen
	Péptido señal	Péptido maduro		
hiracina JM79	MKKKVLKHCIVILGILGTCLAGIGTGIVDA	ATYYGNGLYCNKEKQWVDWNQAKGEIGKIIIVNGWVNHGWPAPRR	<i>E. hirae</i> DCH5	Contenido intestinal de ánade real
bacteriocina RC714		ATYYGNGLYCNKEKQWVDWNQAKGEIGKIIIVNGWVNHGWPAP	<i>E. faecium</i> RC714	Exudado humano
bacteriocina 31	MKKKL----VICGIIGIGFTALGTN--VEA	ATYYGNGLYCNKQKQWVDWNKASREIGKIIIVNGWVQHGWPAPR	<i>E. faecalis</i> Y1717	Aislado clínico
bacteriocina T8	MKKKVLKHCIVILGILGTCLAGIGTGIVDA	ATYYGNGLYCNKEKQWVDWNQAKGEIGKIIIVNGWVNHGWPAPRR	<i>E. faecium</i> T8	Secreción vaginal humana

^a Hiracina JM79 (este trabajo), bacteriocina RC714 (Del Campo y col., 2001), bacteriocina 31 (Tomita y col., 1996) y bacteriocina T8 (De Kwaadsteniet y col., 2006).

^b Los aminoácidos diferentes se destacan en negrita.

Conviene resaltar que la caracterización simultánea e independiente de bacteriocinas producidas por BAL por grupos de investigación no relacionados, es un hecho inesperado aunque no por ello infrecuente en el campo de las bacteriocinas. Así, por ejemplo, la pediocina Ach producida por *Pediococcus acidilactici* H (Motlagh y col., 1992) resultó ser idéntica a la pediocina PA-1 producida por *P. acidilactici* PAC1.0 (Marugg y col., 1992), mientras la curvacina A producida por *Lactobacillus curvatus* LTH1174 (Tichaczek y col., 1992) es exactamente igual que la sakacina A producida por *Lactobacillus sakei* Lb706 (Holck y col., 1992). Dichas bacteriocinas se reconocen en la literatura científica como pediocina Ach/ pediocina PA-1 y como curvacina A/ sakacina A, respectivamente. Así pues, ya que la hiracina JM79 es producida por una especie diferente de enterococo, *E. hirae* DCH5, aislado además de un nicho ecológico

diferente al de la bacteriocina T8 producida por *E. faecium* T8 (De Kwaadsteniet y col., 2006), dichas bacteriocinas deberían ser conocidas como hiracina JM79/bacteriocina T8.

Continuando con el análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento evaluado de 2.838-pb, se determinó que el tercer *orf*, *orfC*, codifica una proteína parecida (97% de identidad) a la proteína de movilización de *E. faecium* DO (número de admisión en GenBank AAA03000087) y a la proteína de movilización MobC (43% de identidad) de *E. faecalis* BFE 1071 (Balla y col., 2000; Balla y Dicks, 2005). En la región que contiene el hipotético promotor del gen *orfC* se observan los rasgos típicos de un origen de transferencia (*oriT*) (Francia y col., 2004; Smith y Thomas, 2004) incluyendo dos repeticiones invertidas y una secuencia (GAGCTTGC) con gran homología a la secuencia del lugar *cis*-acting *nis* de la familia de plásmidos Gram-positivos IncP/Mobp (Smith y Thomas, 2004; Criado y col., 2006a). El cuarto *orf*, *orfD*, codifica una proteína de gran homología (99% de identidad) con el dominio relaxasa/nucleasa de movilización descrito en el plásmido pCIZ2 que codifica la enterocina Q de *E. faecium* L50 (Criado y col., 2006a). También presenta gran similitud, aunque en menor grado (93% de identidad), con un dominio análogo descrito en *E. faecium* D0 (número de admisión en GenBank AAK03000087) y con la proteína de movilización MobA (44% de identidad) de *E. faecalis* BFE 1071 (Balla y Dicks, 2005). Un rasgo típico de esta familia de proteínas es la presencia de tres motivos altamente conservados (I, II y III) en el dominio N-terminal de la relaxasa (Francia y col., 2004). Interesantemente, el *orfD* codificado por *E. hirae* DCH5 presenta una mayor homología (93% de identidad) con el dominio relaxasa/nucleasa de movilización de *E. faecium* DO que con el dominio que codifica el *orf4* próximo a la bacteriocina T8 (75% de identidad) (De Kwaadsteniet y col., 2006), lo que sugiere que las proteínas codificadas por los *orfD* (próximo a la HirJM79) y *orf4* (próximo a la bacteriocina T8) no son idénticas.

El trabajo realizado incluye la secuencia de 2.838 nucleótidos del operón de la HirJM79, una hipotética proteína de movilización, un dominio relaxasa/nucleasa de movilización y de una hipotética proteína, aunque los genes situados por debajo del gen estructural de HirJM79 parecen no ser idénticos a aquéllos situados en las proximidades de la bacteriocina T8. Además, no se han hallado plásmidos residentes en *E. hirae* DCH5, lo que sugiere que dicho operón puede estar integrado en el cromosoma bacteriano. Sin embargo, la presencia de una proteína de movilización, de una relaxasa y de una posible secuencia *oriT* en las inmediaciones de los genes que codifican la HirJM79 y su hipotética proteína de inmunidad (HirJM79) refuerzan la intención de invertir esfuerzos en el esclarecimiento de la estructura genética completa del fragmento de ADN que codifican éstas y, posiblemente, otras funciones relacionadas con la producción de la HirJM79 y que puedan contribuir a su transferencia y movilización entre enterococos.

Poco se conoce acerca de la transmisión evolutiva de bacteriocinas entre diferentes bacterias, pero la conservación de operones que codifican bacteriocinas sugiere que la producción de dichos péptidos antimicrobianos confiere ventajas adaptativas a la cepa productora. Por ello, convendría emprender trabajos dirigidos a elucidar los mecanismos de transferencia y movilización entre las BAL de los operones que codifican bacteriocinas, incluyendo los relativos a la HirJM79, bacteriocina T8 (De Kwaadsteniet y col., 2006) y bacteriocina RC714 (Del Campo y col., 2001) producidas por enterococos aislados de ecosistemas muy diferentes.

VII.2.3. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA Y EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA HIRACINA JM79 EN *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, *E. faecalis* Y *E. faecium*

Cuando los plásmidos derivados del plásmido pMG36c, denominados pJPH1 (*hirJM79*) y pJPH2 (*hirJM79+hiriJM79*), portando el gen estructural y el gen estructural más el hipotético gen de inmunidad de la HirJM79 respectivamente, se utilizaron para transformar células competentes de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 resistentes a la HirJM79 (Hir^R), se observó que mientras los sobrenadantes de la cepa control *L. lactis* IL1403 (pMG36c) no mostraron efecto antagonista, los sobrenadantes de *L. lactis* IL1403 (pJPH1) y *L. lactis* IL1403 (pJPH2) exhibieron una potente actividad antimicrobiana frente *E. faecium* T136 (Fig. IV.3.A). Además, los halos de inhibición producidos por cepas de *L. lactis* IL1403 transformadas con pJPH1 o pJPH2, eran similares a aquellos producidos por *E. hirae* DCH5, productor de HirJM79, y por *E. faecium* P13, productor de la enterocina P (EntP). Igualmente, cuando los plásmidos recombinantes de *L. lactis* IL1403 se transfirieron a *Lactobacillus sakei* Lb790, cepa también Hir^R , los sobrenadantes de *Lb. sakei* Lb790 (pJPH1) y *Lb. sakei* Lb790 (pJPH2) también manifestaron actividad antimicrobiana frente a *E. faecium* T136 (Fig. IV.3.A). Sin embargo, cuando los plásmidos recombinantes pJPH1 y pJPH2 se transfirieron a *E. faecalis* JH2-2 y *E. faecium* L50/14-2, ambos sensibles a HirJM79 (Hir^S), solamente se obtuvieron células transformadas derivadas de pJPH2 (*hirJM79+hiriJM79*). Los halos de inhibición producidos por *E. faecalis* (pJPH2) y *E. faecium* L50/14-2 (pJPH2), fueron similares o incluso mayores que los producidos por células transformadas de *L. lactis* (Hir^R) y *Lb. sakei* (Hir^R). La inhibición originada por *E. faecium* L50/14-2 (pMG36c) se debe a la producción de EntP (Criado y col., 2006a), mientras que el pequeño efecto antagonista producido por los sobrenadantes de *E. faecalis* JH2-2 (pMG36c) podría atribuirse a moléculas con actividad antimicrobiana aún desconocidas (Fig. IV.3.B). Además, cuando los transformantes de *E. faecalis* JH2-2 y *E. faecium* L50/14-2, portando el plásmido pMG36c o su derivado pJPH2, se usaron como indicadores de la actividad antimicrobiana de *E. hirae* DCH5, productor de HirJM79, se pudo observar que, mientras que las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* transformadas con pMG36c fueron sensibles a la HirJM79, las transformadas con pJPH2 fueron inmunes a su actividad antimicrobiana (Fig. IV.3.C). El hecho de que las cepas recombinantes de *L. lactis* IL1403 y *Lb. sakei* Lb790, resistentes a la hiracina JM79 (Hir^R) y portadoras de los plásmidos pJPH1 (*hirJM79*) o pJPH2 (*hirJM79+hiriJM79*), mostraran actividad antimicrobiana indica que *hirJM79* es el requerimiento mínimo para la producción de HirJM79 biológicamente activa, incluso en ausencia de la hipotética proteína de inmunidad HiriJM79. Sin embargo, el fracaso en la obtención de transformantes a partir de cepas de *E. faecalis* JH2-2 y *E. faecium* L50/14-2, sensibles a la hiracina (Hir^S) empleando para ello el plásmido pJPH1, así como la observación de que las mismas cepas transformadas con pJPH2 presentaban actividad antimicrobiana extracelular y eran inmunes a HirJM79, sugieren que HiriJM79 es efectivamente la proteína de inmunidad de HirJM79. Cuando HirJM79 producida por *L. lactis* IL1403 (pJPH1) se purificó a homogeneidad, se obtuvo un fragmento peptídico de la misma masa molecular que la HirJM79 producida por *E. hirae* DCH5.

De todo lo descrito anteriormente, se desprende que la HirJM79 es producida por las cepas recombinantes de *L. lactis*, *Lb. sakei*, *E. faecalis* y *E. faecium* y se externaliza mediante la ruta general de secreción o sistema Sec-dependiente de las células productoras. Otras bacteriocinas Sec-dependientes producidas por BAL son la acidocina B, divergicina A, bacteriocina 31, enterocina P, lactococina 972, propionicina T1 y enterolisina A (Gutiérrez y col., 2006). *E. hirae*

DCH5 y su bacteriocina podrían tener interés biotecnológico como agentes naturales antimicrobianos en aplicaciones veterinarias, médicas, farmacéuticas o en la industria alimentaria. Sin embargo, el uso de los enterococos como productores de bacteriocinas debe abordarse con cautela, ya que algunos codifican factores potenciales de virulencia (Eaton y Gasson, 2001; Franz y col., 2001; Martín y col., 2006; Sánchez y col., 2007a) y son resistentes a antibióticos de uso en medicina humana e implicados en infecciones nosocomiales hospitalarias (Pillar y Gillmore, 2004; Martín y col., 2006; Sánchez y col., 2007a). Por lo tanto, antes de promover sus posibles aplicaciones biotecnológicas, convendría investigar más a fondo las características tecnológicas y de seguridad de *E. hirae* DCH5 y de su bacteriocina HirJM79.

VII.3. CLONACIÓN Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA HIRACINA JM79, UNA BACTERIOCINA SEC-DEPENDIENTE PRODUCIDA POR *Enterococcus hirae* DCH5, EN OTRAS BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) Y *Pichia pastoris*

RESUMEN

La hiracina JM79 (HirJM79), una bacteriocina Sec-dependiente producida por *Enterococcus hirae* DCH5, se ha clonado y producido por células hospedadoras de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y *Pichia pastoris*. Para la producción heteróloga de HirJM79 en otras bacterias lácticas (BAL), el gen estructural de HirJM79 (*hirJM79*), con o sin su gen de inmunidad (*hiriJM79*), se clonó en el plásmido pMG36c bajo el control del promotor constitutivo P₃₂ y en el plásmido pNZ8048 bajo el control del promotor inducible P_{NisA}. Para la producción de HirJM79 en *P. pastoris*, el gen que codifica la HirJM79 madura se clonó en el vector de expresión pPICZαA. Los plásmidos recombinantes permitieron la producción heteróloga y expresión funcional de HirJM79 biológicamente activa en los sobrenadantes de *L. lactis* IL1403, *L. lactis* NZ9000, *L. sakei* Lb790, *E. faecalis* JH2-2 y *P. pastoris* X-33, la coproducción de HirJM79 y nisina A (NisA) en *L. lactis* DPC5598, así como la coproducción de HirJM79 y enterocina P (EntP) en *E. faecium* L50/14-2. Todas las bacterias lácticas recombinantes produjeron mayores cantidades de HirJM79 que *E. hirae* DCH5, aunque la actividad antimicrobiana de la mayoría de los transformantes fue menor que la esperada en base a su producción de HirJM79. No obstante, la síntesis, procesamiento y secreción de HirJM79 ocurre eficazmente tanto en las BAL recombinantes como en *P. pastoris*.

VII.3.1. CLONACIÓN Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE HirJM79 EN OTRAS BACTERIAS LÁCTICAS (BAL)

Cuando los plásmidos pJPH1 (*hirJM79*) y pJPH2 (*hirJM79+hiriJM79*), derivados del pMG36c, se emplearon para transformar las cepas no bacteriocinogénicas *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* IL1403 y *Lactobacillus sakei* Lb790, ambas resistentes a la HirJM79 (Hir^R), los sobrenadantes de las cepas recombinantes mostraron actividad antimicrobiana frente a *E. faecium* T136. Cuando el plásmido pJPH2 se utilizó para transformar *E. faecalis* JH2-2 y *E. faecium* L50/14-2, sensibles a la HirJM79 (Hir^S), las cepas derivadas originaron halos de inhibición debidos a la HirJM79 de tamaño similar o superior a los producidos por las células recombinantes Hir^R (Fig. IV.3.B). Igualmente, cuando los plásmidos pJPH1 y pJPH2 se transfirieron a *L. lactis* subsp. *lactis* DPC5598 y *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000, ambas resistentes a la HirJM79 (Hir^R), los sobrenadantes de las células recombinantes derivadas fueron activos frente *E. faecium* T136 (Hir^S y NisA^S) (Fig V.1.A), mientras que los derivados de *L. lactis* DPC5598 mostraron, además, actividad antimicrobiana frente *L. lactis* MG1363 (Hir^R y NisA^S) (Fig V.1.B). Por otro lado, cuando los derivados del plásmido pNZ8048, pNZH3 (*hirJM79*) y pNZH4 (*hirJM79+hiriJM79*) se transfirieron a *L. lactis* NZ9000 todos los recombinantes manifestaron actividad antimicrobiana frente *E. faecium* T136 tras ser inducidos con NisA (Fig. V.1.C). El que todas las BAL recombinantes mostraran actividad antimicrobiana (Fig. V.1) confirma que *hirJM79* constituye el requerimiento mínimo para la producción de HirJM79 biológicamente activa en hospedadores resistentes a la bacteriocina (Hir^R).

Conviene también destacar que, a diferencia de la mayoría de estudios publicados en los que la producción heteróloga de péptidos antimicrobianos se determina cualitativamente mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con docecil sulfato sódico (SDS-PAGE) o mediante ensayos de Western-blott, el uso de anticuerpos específicos anti-HirJM79 y la puesta a punto de un ensayo inmunoenzimático no competitivo indirecto (ELISA-NCI) permitieron, en el presente trabajo, la identificación y cuantificación de la producción extracelular de HirJM79 en los sobrenadantes de las BAL transformadas (Tabla V.3). Las cepas transformadas derivadas de *L. lactis* produjeron mayores cantidades de HirJM79 que *E. hirae* DCH5. La producción de HirJM79 por las cepas de *L. lactis* IL1403, transformadas con los plásmidos pJPH1 y pJPH2 fue 5,5 y 7,8 veces mayor, respectivamente, que la producción de dicha bacteriocina por *E. hirae* DCH5, mientras que la producción de HirJM79 por las cepas de *L. lactis* NZ9000 transformadas con los mismos plásmidos resultó ser 3 y 3,9 veces mayor, respectivamente, que la de la cepa control *E. hirae* DCH5. Diferencias en la producción de bacteriocinas por distintas cepas de lactococos se han observado con anterioridad y podrían deberse a diferencias todavía desconocidas en el metabolismo de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 y *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (Gutiérrez y col., 2006; Horn y col., 1998; Martín y col., 2007; Martín y col., 2007b).

La producción de HirJM79 por las cepas de *L. lactis* NZ9000 transformadas con los plásmidos pNZH3 y pNZH4 fue 4,7 y 8,5 veces superior, respectivamente, a la producción de HirJM79 por *E. hirae* DCH5. El incremento de actividad antimicrobiana de la cepa *L. lactis* NZ9000 transformada con los vectores pNZH3 y pNZH4 (respecto a la actividad antimicrobiana manifestada por la misma cepa transformada con los vectores pJPH1 y pJPH2) podría deberse al breve período de inducción para la producción de HirJM79, lo que previene la adhesión de la bacteriocina a la pared celular de la cepa productora, su degradación por la acción de las proteasas, o la formación de agregados. Sin embargo, la producción de HirJM79 también depende del vector de expresión empleado (Tabla V.3). La mayor producción de HirJM79 en los sobrenadantes de *L. lactis* NZ9000, transformadas con vectores inducibles por la nisina, puede deberse a diferencias en el número de copias de los plásmidos pNZ8048 y pMG36c, aunque, más probablemente, se deba a la eficacia de transcripción de los promotores encargados de dirigir la expresión génica (De Vos, 1987; Kok y col., 1984). Asimismo, la producción de HirJM79 fue superior en las cepas de *L. lactis* portadoras de los plásmidos pJPH2 y pNZH4 que en aquellas transformadas con pJPH1 y pNZH3. Este aumento en la producción de HirJM79 cuando se coexpresan los genes *hirJM79* y *hiriJM79* podría explicarse asumiendo que *L. lactis* es relativamente resistente a HirJM79 pero su resistencia, y posiblemente su producción de bacteriocina, es mayor cuando la HirJM79 se coproduce con la proteína HiriJM79 del gen *hiriJM79*. De hecho, las cepas productoras de bacteriocinas se protegen de la acción antagonista de su propia bacteriocina mediante la expresión simultánea de una proteína de inmunidad afin. Estas proteínas actúan bien alterando la agregación de la bacteriocina y la formación de poros, o bien interfiriendo en la interacción entre la bacteriocina y su receptor de membrana (Gutiérrez y col., 2006). Además, se ha observado que la coexpresión del gen estructural de la bacteriocina y su correspondiente gen de inmunidad también incrementa la producción heteróloga de la enterocina P (EntP), una bacteriocina Sec-dependiente producida por *E. faecium* P13 en lactococos (Gutiérrez y col., 2006).

Por otra parte, la transformación de *L. lactis* DPC5598, un derivado libre de plásmidos de una cepa industrial productora de NisA (Trotter y col., 2006; Gutiérrez y col., 2006; Suárez y col.,

1996), con los plásmidos recombinantes pJPH1 y pJPH2 permitió la coproducción de HirJM79 y NisA (Figs. V.1.A y V.1.B). Así, la producción de HirJM79 por *L. lactis* DPC5598 (pJPH1) y *L. lactis* DPC5598 (pJPH2) fue 4,1 y 5,6 veces superior, respectivamente, a la producción de dicha bacteriocina por *E. hirae* DCH5, mientras que la producción de NisA de *L. lactis* DPC5598 (pMG36c) y sus derivados *L. lactis* DPC5598 (pJPH1) y *L. lactis* DPC5598 (pJPH2) fue similar, constituyendo entre un 46% y un 53% de la producción de NisA de la cepa control *L. lactis* BB24 (Tabla V.3). La menor producción de HirJM79 por las cepas de *L. lactis* DPC5598 recombinantes, en comparación a la de las cepas de *L. lactis* IL1403 transformadas con los mismos plásmidos, podría atribuirse a la producción de más de una bacteriocina en los hospedadores multibacteriocinogénicos, a diferencias génicas o metabólicas entre las cepas productoras o, posiblemente, a la mayor actividad proteolítica de las proteasas de *L. lactis* DPC5598 (Gutiérrez y col., 2006). Igualmente, la menor producción de NisA por las cepas transformantes de *L. lactis* DPC5598 respecto a la producida por *L. lactis* BB24 podría deberse a diferencias génicas y/o metabólicas todavía desconocidas entre dichas cepas. Dado que la NisA es particularmente activa frente cepas de *Clostridium* y sus esporas, y la HirJM79 es una bacteriocina de amplio espectro antimicrobiano con actividad antilisteria, las cepas recombinantes productoras de ambas bacteriocinas podrían ser de interés biotecnológico para la industria alimentaria.

En cuanto a las cepas de *Lactobacillus sakei* Lb790 (pJPH1) y *Lactobacillus sakei* Lb790 (pJPH2), la producción de HirJM79 en sus sobrenadantes libres de células fue también mayor que en los de *E. hirae* DCH5, aunque, al igual que se observó en las cepas transformadas de *L. lactis*, su actividad antimicrobiana y su actividad antimicrobiana específica fueron menores de las esperadas a juzgar por su producción de HirJM79. Finalmente, aunque la producción de HirJM79 por las cepas de *E. faecium* L50/14-2 (pJPH2) y *E. faecalis* JH2-2 (pJPH2) fue tan sólo ligeramente superior a la de *E. hirae* DCH5, su actividad antimicrobiana fue significativamente mayor (Tabla V.3). Estos resultados sugieren la eficacia del SP_{HirJM79} (péptido señal de la HirJM79) para dirigir la síntesis, procesamiento y secreción de HirJM79 en otras BAL. La producción y liberación extracelular de péptidos y proteínas es ventajosa respecto a su producción citosólica, siendo la secreción de proteínas y su liberación extracelular un medio predominante de producción de moléculas biológicamente activas por las BAL (Dieye y col., 2003).

Sin embargo, tanto la actividad antimicrobiana como la actividad antimicrobiana específica de las cepas transformadas de *L. lactis* fue menor que la esperada teniendo en cuenta su producción de HirJM79. El que la purificación de la HirJM79 producida por *L. lactis* IL1403 (pJPH1) y *E. hirae* DCH5 originasen tras su análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS) fragmentos de idéntica masa molecular (Sánchez y col., 2007b), sugiere que la HirJM79 es sintetizada, procesada y liberada correctamente por las células de *L. lactis*. No obstante, es posible que la formación de puentes disulfuro (DSB, del inglés “Disulfide Bond”) entre las Cys 10 y Cys 15 de la HirJM79 no tenga lugar adecuadamente en los lactococos. Los DSB constituyen un mecanismo conservado y universal de estabilización de proteínas extracitoplásmicas, en el que intervienen tiol-disulfuro oxidoreductasas, las cuales catalizan su construcción, destrucción e isomerización en proteínas y péptidos de interés (Kadokura y col., 2003). No obstante, aún queda mucho por conocer acerca de la función de las tiol-disulfuro oxidoreductasas en la mayoría de las bacterias (Kouwen y col., 2007). Aunque *L. lactis* sintetiza proteínas con DSB, la

secuenciación completa del genoma de varios lactococos no ha revelado la presencia de genes lactocócicos homólogos a los involucrados en la formación de DSB en otras bacterias (Freitas y col., 2005). Otra posibilidad es que la HirJM79 experimente cambios conformacionales que se traduzcan en formas menos activas de HirJM79. Del mismo modo, es posible que el procesamiento post-traducciona de la pre-HirJM79 a la HirJM79 activa sea menos eficaz en cepas del género *Lactococcus* que en las del género *Enterococcus* como ocurre con otras bacteriocinas producidas por cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Ennahar y col., 1996; Horn y col., 1998). Una mayor agregación de la HirJM79 y/o una mayor actividad proteolítica de las cepas productoras de bacteriocinas podrían ser también los causantes de la menor actividad antimicrobiana de la HirJM79 producida tanto por las cepas lactocócicas como por *Lactobacillus sakei* Lb790. De hecho, se sabe que la EntP, una bacteriocina Sec-dependiente de la clase IIa similar a la HirJM79, tiende a formar agregados que reducen su actividad biológica (Gutiérrez y col., 2004). No obstante, *E. faecium* L50/14-2 (pJPH2) y *E. faecalis* JH2-2 (pJPH2) producen la HirJM79 con mayor actividad antimicrobiana específica que la de *E. hirae* DCH5. El que la HirJM79 producida por *E. hirae* DCH5 sea idéntica a la bacteriocina T8 producida por *E. faecium* T8 y a la bacteriocina 43 producida por *E. faecium* VRE82, y muestre homología con la bacteriocina RC714 producida por *E. faecium* RC714, con la bacteriocina 31 producida por *E. faecalis* Y1717 y con la EntP producida por *E. faecium* P13 (Sánchez y col., 2007b), permite hipotetizar que *E. faecium* y *E. faecalis* se comporten como hospedadores más eficaces de la HirJM79 que *E. hirae* DCH5. Sin embargo, a pesar de la disminución de la actividad antimicrobiana específica de la HirJM79 producida por lactococos, su empleo o el de sus sobrenadantes libres de células puede ser atractivo por sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

El empleo de microorganismos de uso alimentario como cepas productoras de bacteriocinas podría ser un medio a través del cual poder explotar los beneficios y ventajas de los compuestos antimicrobianos en la industria alimentaria. La producción heteróloga de bacteriocinas por otros hospedadores puede basarse en la expresión de genes nativos, en el intercambio de secuencias líder y/o de los sistemas de procesamiento, transporte y secreción de unas bacteriocinas con otras o en la fusión de nucleótidos que codifican la bacteriocina madura a péptidos señal que actúen como señales de procesamiento, transporte y secreción (Gutiérrez y col., 2006). De los resultados de este trabajo se deduce que la elevada producción de HirJM79 por otras BAL a través de utilización de su ruta general de secreción (GTS) es eficaz en diversas cepas de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, *E. faecium* y *E. faecalis*. Por ello no resulta razonable observar cómo la mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL poseen un sistema dedicado de procesamiento, transporte y secreción (DTS) de sus bacteriocinas cuando podrían acceder a su ruta general de secreción (GTS) o sistema Sec-dependiente provistas de un péptido señal adecuado. Fusiones del SP_{HirJM79} a la secuencia nucleotídica de la forma madura de otras bacteriocinas puede permitir a otras BAL producir y liberar dichas bacteriocinas en sus sobrenadantes libres de células en ausencia de proteínas de inmunidad y de secreción. Quimeras de pediocina PA-1 (PedA-1) y enterocina A (EntA) fusionadas al péptido señal de la EntP (SP_{EntP}) han permitido la producción y expresión funcional de ambas bacteriocinas en *L. lactis* (Martín y col., 2007a; Martín y col., 2007b). Sin embargo, sería conveniente mejorar e incrementar la actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de las bacteriocinas producidas por otras BAL. En este sentido, la construcción de cepas de *L. lactis* deficiente en sus proteasas mayoritarias, tanto intracelular (ClpP) como extracelular (HtrA), podría resultar útil en

la producción heteróloga de péptidos más estables (Cortés-Pérez y col., 2006). Asimismo, la producción heteróloga de péptidos y proteínas con DSB estables constituye también un reto en el desarrollo de BAL manipuladas genéticamente para la expresión de péptidos biológicamente activos (Freitas y col., 2005).

VII.3.2. CLONACIÓN Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA HirJM79 EN *Pichia pastoris*

Las levaduras todavía no se han evaluado suficientemente como hospedadores alternativos de la producción heteróloga de bacteriocinas. Sin embargo, en este trabajo se ha logrado la producción heteróloga y expresión funcional de la HirJM79 en *P. pastoris*, una levadura metilotrófica (Ilgen y col., 2005). Para ello, el plásmido pPICZαA se ha seleccionado como vector de expresión porque contiene: (i) el péptido señal de la feromona α-MF (del inglés “Alpha Mating factor”) de *Saccharomyces cerevisiae* que dirige el procesamiento y secreción de los péptidos fusionados a dicha señal a través de la ruta general de secreción de *P. pastoris*; (ii) un promotor inducible por metanol que permite la sobreexpresión de los genes que se encuentran bajo su control; y (iii) la secuencia nucleotídica AOX1 que facilita la integración del vector linearizado en el genoma de *P. pastoris* (Fig.7.2).

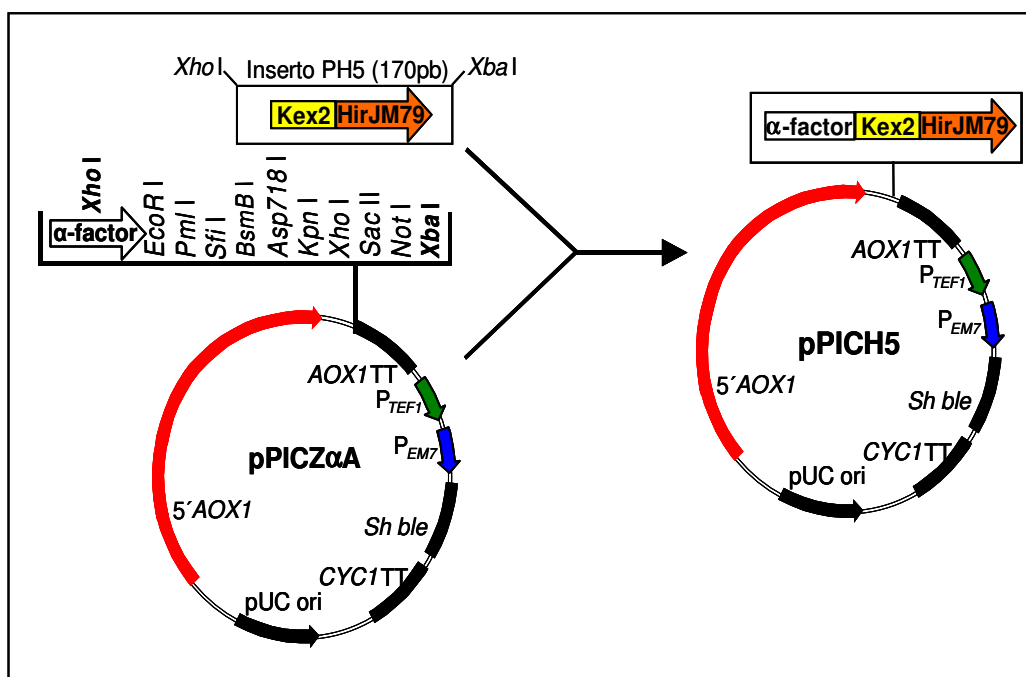


Fig. 7.2. Construcción del plásmido recombinante pPICH5 derivado del vector de expresión pPICZαA. El fragmento 5' AOX1 contiene el promotor de la enzima alcohol oxidasa (P_{AOX1}) y permite la integración del vector en el genoma de *Pichia pastoris*; pUC ori, origen de replicación del plásmido en *Escherichia coli*; AOX1 TT, terminador de la transcripción de P_{AOX1} ; P_{TEF1} y P_{EM7} : promotores que dirigen la expresión del gen *Sh ble* en *P. pastoris* y *E. coli*, respectivamente; *Sh ble*, gen de resistencia a la zeocina; CYC1 TT, terminador de la transcripción de P_{TEF1} y P_{EM7} ; HirJM79, secuencia nucleotídica de la forma madura de la hiracina JM79; Kex2, señal de procesado en *P. pastoris*; α-factor, péptido señal de la feromona α-MF (del inglés “Alpha Mating Factor”).

Entre las células de *P. pastoris* X-33 transformadas con el plásmido linearizado pPICH5 se seleccionó el clon *P. pastoris* X-33TH por su mayor actividad antimicrobiana observada mediante la realización de una prueba de siembra en picadura (resultados no mostrados). Posteriormente, la producción heteróloga y la actividad antimicrobiana de la HirJM79 producida por *P. pastoris* X-

33TH, desarrollada en distintos medios de cultivo, se determinó y cuantificó mediante la utilización de anticuerpos policlonales anti-HirJM79 de especificidad predeterminada y de técnicas inmunoenzimáticas apropiadas (ELISA-NCI), así como por ensayos de medición de su actividad antimicrobiana en los sobrenadantes libres de células (ADT y MPA). Así pues, como se observa en la Fig. V.2, los sobrenadantes de *P. pastoris* X-33TH desarrollados en el medio mínimo BMM produjeron halos de inhibición más pequeños (Fig.V.2.A) que los sobrenadantes del mismo cultivo desarrollado en el medio complejo BMMY (Fig.V.2.B). Además, la actividad antimicrobiana de los cultivos obtenidos en medio BMMY persistió más tiempo que la de los cultivos obtenidos en medio BMM. Los resultados mostrados en la Tabla V.4 indican que la máxima producción de HirJM79 durante el desarrollo de *P. pastoris* X-33TH en BMM fue 5 veces mayor que la producción de HirJM79 por *E. hirae* DCH5, aunque su máxima actividad antimicrobiana y su máxima actividad antimicrobiana específica significaron el 33% y el 9%, respectivamente, en relación a las de la HirJM79 producida por *E. hirae* DCH5. Sin embargo, la máxima producción de HirJM79 producida por *P. pastoris* X-33TH desarrollada en medio BMMY fue 2 veces superior a la la HirJM79 producida por *E. hirae* DCH5, y su máxima actividad antimicrobiana constituyó el 76% de la actividad antimicrobiana de la HirJM79 producida por la cepa control. En cuanto a la máxima actividad antimicrobiana específica de la HirJM79 producida por *P. pastoris* X-33TH desarrollada en medio BMMY, ésta representó un 42% de la actividad antimicrobiana específica de la HirJM79 producida por *E. hirae* DCH5. La elevada producción de HirJM79 en medio mínimo BMM comparada con la alcanzada en el medio complejo BMMY puede atribuirse a un mejor reconocimiento antigénico de la HirJM79 por los anticuerpos anti-HirJM79. Sin embargo, la actividad de las proteasas producidas por *P. pastoris* X-33TH podrían ser responsables de la actividad antimicrobiana reducida de los sobrenadantes de *P. pastoris* X-33TH desarrollados en BMM comparado con los sobrenadantes obtenidos en medio BMMY (Tabla V.4). No obstante, la producción de HirJM79 por *P. pastoris* X-33TH desarrollada en medio BMMY fue mayor que la de los enterococos, incluido *E. hirae* DCH5, aunque no superó la de los lactobacilus ni lactococos, si bien tanto su actividad antimicrobiana como su actividad antimicrobiana específica fueron menores de lo esperado en base a su producción de HirJM79 (Tabla V.4).

La purificación del péptido antimicrobiano producido por *P. pastoris* X-33TH desarrollada en BMMY permitió un incremento de su actividad antimicrobiana específica de 2.804 veces y una recuperación de su actividad antimicrobiana inicial del 9% (Tabla V.5). El análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS) de la fracción purificada mostró un pico mayoritario de 5.093,2 Da, lo que sugiere que el péptido resultante se ha purificado a homogeneidad (resultados no mostrados). El que la HirJM79 purificada de *P. pastoris* X-33TH (resultados no mostrados) y de *E. hirae* DCH5 (Sánchez y col., 2007a) mostraran idénticas masas moleculares, sugiere que fenómenos post-traduccionales típicos de las levaduras, como la glucosilación de proteínas y peptidos, no han tenido lugar (Daly y Hearn, 2005). No obstante, como se ha sugerido previamente, es posible que la actividad proteolítica de proteasas neutras sean responsables de la pérdida de actividad antimicrobiana de los sobrenadantes *P. pastoris* X-33JS desarrollados en BMMY. Aunque otras bacteriocinas como la pediocina PA-1 (Beaulieu y col., 2005; Schoeman y col., 1999) y la plantaricina 423 (Van Reenen y col., 2002) se han producido por células hospedadoras de *S. cerevisiae* y *P. pastoris*, no se detectó actividad antimicrobiana alguna en sus sobrenadantes libres de células. Actualmente, la EntP (Gutiérrez y col., 2005a) y

la HirJM79 son las únicas bacteriocinas con actividad biológica producidas por células recombinantes de *P. pastoris*.

La producción de HirJM79 por *P. pastoris* X-33TH puede facilitar futuras aplicaciones biotecnológicas de esta bacteriocina como péptido antimicrobiano natural en la industria alimentaria y farmacéutica, así como en medicina humana y veterinaria. Sin embargo, antes de abordar aplicaciones a escala industrial de esta bacteriocina, deberían desarrollarse estrategias que permitan la óptima producción de HirJM79 por *P. pastoris* X-33TH.

VII.4. *Enterococcus faecalis* DBH18, AISLADO DE ÁNADES REALES (*Anas platyrhynchos*), CODIFICA LOS GENES *ef1097* Y *entL50A-entL50B* RESPONSABLES DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS, Y UN GEN SIMILAR AL *entL50B*, DENOMINADO *entJS*

RESUMEN

La cepa *E. faecalis* DBH18 se aisló de ánades reales (*Anas platyrhynchos*) durante la evaluación de los aspectos higiénicos (actividad antimicrobiana) y de seguridad (factores de virulencia) asociados a enterococos presentes en el intestino y canal de especies animales aptas para la caza y el consumo humano (Sánchez y col., 2007a). Resultó de interés en dicho estudio la observación de que todos los *E. faecalis* aislados codificaban genes asociados a factores de virulencia y que todos, excepto *E. faecalis* DBH18, mostraron una potente actividad antimicrobiana directa no detectable en sus sobrenadantes libres de células. Esto sugiere que la producción de péptidos antimicrobianos unido a la presencia de factores potenciales de virulencia, contribuya a una mayor competitividad de las cepas virulentas de *E. faecalis* tanto en el tracto intestinal de animales y personas como en los alimentos.

Cuando el ADN genómico purificado de *E. faecalis* DBH18, aislado de ánades reales (*A. platyrhynchos*), se amplificó por PCR con cebadores derivados del gen *ef1097* que codifica la enterocina V583 producida por *E. faecalis* V583 y con cebadores derivados de los genes *entL50A-entL50B* de *E. faecium* L50, productor de la enterocina L50 (EntL50A y EntL50B), la secuenciación nucleotídica de los fragmentos generados demostró que *E. faecalis* DBH18 codificaba los genes *ef1097* y *entL50A-entL50B*, así como un gen similar al *entL50B*, denominado *entJS*. La secuencia nucleotídica de *entL50A-entL50B* fue idéntica en *E. faecalis* DBH18 y en *E. faecium* L50, aunque por técnicas de PCR-anidado se determinó que dichos genes en *E. faecalis* DBH18 podrían mostrar una localización diferente en ambos microorganismos. La secuenciación posterior de los fragmentos génicos de *E. faecalis* DBH18 conteniendo *entJS*, reveló la existencia en el ADN genómico purificado analizado de tres hipotéticos marcos de lectura abiertos (ORFs). El primero de ellos (*entJS*) codifica un péptido de 43 aminoácidos de una masa molecular teórica de 5.182,2 Da. El segundo *orf* (*orfB*) codifica un péptido de 89 aminoácidos de una masa molecular teórica de 10.636,2 Da. Por su parte, el último *orf* (*orfC*) codifica otra proteína de 89 aminoácidos de una masa molecular teórica de 10.552,8 Da. La evaluación de la actividad antimicrobiana del producto del gen *entJS* (EntJS) obtenido mediante experiencias de transcripción y translación *in vitro*, así como mediante la producción heteróloga de EntJS en *Pichia pastoris*, sugieren que *entJS* es el gen responsable de la producción y expresión funcional del péptido antimicrobiano enterocina JS (EntJS). De los resultados obtenidos en este trabajo se deduce que *E. faecalis* DBH18 codifica múltiples bacteriocinas cuya secuencia nucleotídica y actividad antimicrobiana puede no limitarse a especies determinadas de enterococos ni al origen alimentario, clínico o ambiental de los enterococos que las codifican.

VII.4.1. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA DE GENES DE *E. faecium* L50 y *E. faecalis* DBH18 PRODUCTORES DE BACTERIOCINAS

La amplificación por PCR de ADN genómico purificado de *E. faecalis* DBH18 con los cebadores EF1097-F3 y EF1097-R3, a diferencia de lo observado al emplear ADN genómico purificado de *E. faecium* L50, permitió la amplificación de un fragmento de 468-pb que, probablemente, corresponde al gen *ef1097* que codifica la enterocina V583 (EntV583) producida por *E. faecalis* V583 (Paulsen y col., 2003; Swe y col., 2007) (resultados no mostrados). La amplificación por PCR con los cebadores citados previamente de ADN genómico purificado de otros *E. faecalis* aislados de ánades reales (cepas DBC5, DCH9, DAC10, DBC16, DCC32, DAC9, DBH9, DBC4 y DEC23), demostró la presencia en las muestras de fragmentos génicos del tamaño citado previamente aunque ninguno de dichos aislados mostró actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes libres de células (Sánchez y col., 2007a). Es conocido que algunas BAL y otras bacterias con actividad antimicrobiana no manifiestan actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes a pesar de ser portadoras de genes estructurales de bacteriocinas, lo que sugiere que requieren determinados estímulos que permitan la producción y actividad antimicrobiana de sus bacteriocinas (Lux y col., 2007; Sánchez y col., 2007a). La secuenciación del fragmento de 486-pb de *E. faecalis* DBH18 determinó que su secuencia nucleotídica era idéntica al gen *ef1097* de *E. faecalis* V583, excepto en cuatro nucleótidos sin repercusión en la secuencia aminoacídica y por la sustitución de una guanina por adenina que origina una modificación en la secuencia aminoacídica de la proteína madura EF1097 (enterococina V583), resultando en la sustitución de un triptófano (TGG) por un códon de terminación (TGA) en la posición 99 de la EntV583 madura, constituida por 136 aminoácidos. Dicha modificación no se detecta en la secuencia de *ef1097* de otros *E. faecalis* (cepas JH2-2, DBH9 y DCH9) evaluadas en este trabajo (resultados no mostrados). Es posible que este codon de terminación prematuro sea responsable de un fenotipo bacteriocinogénico sin actividad antimicrobiana. No obstante, la expresión de *ef1097* en enterococos se encuentra estrechamente regulada y asociada a la de otros factores de virulencia, por lo que es difícil determinar el resultado biológico funcional resultante del codon de terminación descrito (Bourgogne y col., 2006; Swe y col., 2007).

Del mismo modo, la amplificación por PCR con ADN purificado empleando previamente empleando los cebadores EntL50-R1 y EntL50-R2 revelaron que, mientras el ADN genómico de *E. faecium* L50 permitió la amplificación de un único fragmento de un tamaño aproximado de 286-pb, el ADN genómico de *E. faecalis* DBH18 permitió la amplificación de dos fragmentos, uno de aproximadamente 286-pb y otro más pequeño de, aproximadamente, 130-pb (Fig. VI.1). La secuenciación de este último fragmento reveló una secuencia nucleotídica de 132-pb, homóloga, pero no idéntica, a la del gen *entL50B* de *E. faecium* L50 (Cintas y col., 1998). Sin embargo, la secuenciación del fragmento de 400-pb, amplificado con los cebadores L50J40-F y L5040-R a partir de ADN genómico de *E. faecium* L50 y *E. faecalis* DBH18 (Fig.VI.1), determinó la existencia en ambas cepas de una secuencia nucleotídica idéntica a la de los genes *entL50A-entL50B* de *E. faecium* L50 (resultados no mostrados). *E. faecalis* DBH18 no parece poseer genes que codifican otras bacteriocinas conocidas (Sánchez y col., 2007a). Sin embargo, se conoce que enterococos como *E. durans* (Batdorj y col., 2006) y otras cepas de *E. faecium* de distintos orígenes (Moreno y col., 2002; Achemechen y col., 2005; Martín y col., 2006; Sánchez y

col., 2007; Teppangna y col., 2007) codifican bacteriocinas idénticas o similares a la enterocina L50 (EntL50A y EntL50B).

Experiencias de PCR anidado con el ADN genómico purificado de *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50, empleando cebadores diseñados a partir de los genes *entL50A-entL50B* de *E. faecium* L50 así como de los ORFs colindantes, sugieren que los genes adyacentes a *entL50A-entL50B* no son idénticos en *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50 (Fig.VI.2), de lo que se desprende que *entL50A-entL50B* y sus genes adyacentes se encuentran en una localización diferente en *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50. En *E. faecium* L50, los genes *entL50A-entL50B* se localizan en el plásmido pCIZ1 de 50-kb (Cintas y col., 2000; Criado y col., 2006a), mientras que en la cepa de *E. faecium* F58 dichos genes se encuentran en un plásmido de 22-kb (Achemechen y col., 2005) y en *E. faecium* 6T1a están localizados en el plásmido pEF1 de 21-kb (Ruíz-Barba y col., 2006). Sin embargo, cepas carentes de plásmidos como las de *E. faecium* BFE1072 y *E. faecium* B2 también producen la EntL50 (EntL50A y EntL50B) (Cintas y col., 2000). Además, en este trabajo no se ha detectado la presencia de plásmidos en *E. faecalis* DBH18 (resultados no mostrados), lo que sugiere que los genes *entL50A-entL50B* podrían estar integrados en el cromosoma. Una cantidad sin precedentes del genoma de *E. faecalis* V583 manifiesta la existencia de complejas estructuras en mosaico lo que sugiere la presencia de “puntos calientes” para la inserción de elementos genéticos móviles (Paulsen y col., 2003). En consecuencia, de elevado interés científico sería la determinación de la secuencia nucleotídica de los genes adyacentes al fragmento *entL50A-entL50B* en *E. faecalis* DBH18, los cuales podrían contribuir al procesamiento y secreción de entL50A y entL50B y/o a su transferencia y movilización entre los enterococos.

VII.4.2. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN SIMILAR AL *entL50B* Y DE LOS GENES ADYACENTES EN *E. faecalis* DBH18

La secuenciación nucleotídica por técnicas de PCR inversa de un fragmento de ADN genómico de *E. faecalis* DBH18, conteniendo un gen similar al *entL50B*, permitió el análisis genético de una secuencia de 901 nucleótidos (número de admisión en GenBank EF502034) con tres posibles marcos de lectura abiertos (ORFs) denominados *entJS*, *orfB* y *orfC* (Fig.VI.3). El primer *orf*, *entJS*, codifica un péptido de 43 aminoácidos de una masa molecular estimada de 5.182,25 Da, cuya secuencia nucleotídica presenta doce diferencias respecto al gen *entL50B* de *E. faecium* L50 en las posiciones 20, 25, 26, 37, 44, 46, 49, 70, 76, 82, 119 y 132, dando lugar a dos modificaciones en su secuencia aminoacídica en las posiciones 9 (de Thr a Ala) y 15 (de Leu a Phe). Cuando su secuencia nucleotídica se comparó con la de otros genes registrados en bases de datos informatizadas, se determinó que *entJS* era idéntico al gen *entNB* (100% de identidad; número de admisión en GenBank AB292312) de *E. faecalis* N1-33, aislado de vegetales fermentados (resultados no publicados). El gen *entJS* también reveló una gran homología con *mr10B* (99% de identidad, GenBank DQ366596) de *E. faecalis* MRR 10-3, aislado de la glándula uropigial de la abubilla (*Upupa epops*) (Martín-Platero y col., 2006), con *ent62-B* (91% de identidad, GenBank EF112398) de una cepa vaginal de *E. faecium* 62-6 (resultados no publicados), con *entJ* (91% de identidad, GenBank DQ198088) de *E. faecium* 6T1a aislado de aceitunas fermentadas (Floriano y col., 1998), y con *entL50B* (91% de identidad, GenBank AJ223633) de *E. faecium* L50 aislado de un embutido crudo curado (Cintas y col., 1998). Sin embargo, mientras las bacteriocinas codificadas por los pares de genes *entNA* y *entNB*

(GenBank AB292312), *mr10A* y *mr10B* (Martín-Platero y col., 2006), *ent62-A* y *ent62-B* (GenBank EF112398), *entI* y *entJ* (Ruíz-Barba y col., 2006), y *entL50A* y *entL50B* (Cintas y col., 1998) se encuentran, a nivel genético, organizadas linealmente y separadas por una breve (<30-pb) región intergénica, presumiblemente en una única unidad de transcripción, los esfuerzos realizados en este trabajo para determinar la secuencia nucleotídica hacia arriba del gen *entJS* de *E. faecalis* DBH18 han sido infructuosos. Otras bacteriocinas sin una extensión N-terminal y codificadas como péptidos individuales son la enterocina Q (Cintas y col., 2000), enterocina RJ-11 (Yamamoto y col., 2003) y la enterocina EJ97 (Sánchez-Hidalgo y col., 2003).

El segundo *orf*, *orfB*, se localizó 220-pb hacia abajo del códon de terminación de *entJS* y, probablemente, codifica una proteína de 89 aminoácidos de una masa molecular calculada de 10.636,27 Da. Cuando se comparó la secuencia aminoacídica del péptido codificado por *orfB* con la de otros péptidos registrados en bases de datos informatizadas, dicho péptido mostró una identidad del 100% con otro codificado por un posible ORF de *E. faecalis* N1-33 (GenBank AB292312), así como una identidad del 89% con una hipotética proteína codificada por *E. faecium* 6T1a (GenBank DQ198088) y una homología también del 89% con el producto del gen *orfE* de *E. faecium* L50 (Cintas y col., 1998). Por otra parte, el tercer *orf*, *orfC*, localizado inmediatamente después de *orfB*, posiblemente codifica una proteína de 89 aminoácidos de una masa molecular estimada de 10.552,87 Da. El péptido hipotéticamente codificado por *orfC*, mostró un 97% de identidad con el péptido codificado por un posible ORF de *E. faecalis* N1-33 (GenBank AB292312). De gran interés sería determinar el posible papel que desempeñan los genes *orfB* y *orfC* en la inmunidad y/o la producción de las enterocinas producidas por *E. faecalis* DBH18.

VII.4.3. TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN *IN VITRO* DEL GEN *entJS* DE *E. faecalis* DBH18

Debido a que la purificación del péptido hipotéticamente codificado por el gen *entJS*, similar al codificado por *entL50B* y ambos producidos por *E. faecalis* DBH18, habría resultado complicada mediante el empleo de procedimientos bioquímicos basados en la utilización de distintos soportes cromatográficos, la hipotética actividad antimicrobiana del producto del gen *entJS* se determinó mediante un ensayo combinado de transcripción/traducción *in vitro*. El plásmido pETBlueJS que codifica el gen *entJS* y los plásmidos pRSETB-*entL50A* y pRSETB-*entL50B* que codifican, respectivamente, los genes *entL50A* y *entL50B* (Cintas y col., 1998) se emplearon como ADN molde para la síntesis *in vitro* de EntJS, EntL50A y EntL50B. La actividad antimicrobiana de los péptidos sintetizados se evaluó individualmente o combinados en una proporción de 1:1 (v/v) (Tabla VI.2). El péptido producto del gen *entJS* mostró actividad antimicrobiana tanto individualmente como combinado con EntL50A y EntL50B. La combinación de EntL50A con EntL50B o EntJS mostró una mayor actividad antimicrobiana que la suma de las actividades antimicrobianas de las bacteriocinas evaluadas individualmente. En cambio, la combinación de EntL50B y EntJS presentó un efecto antimicrobiano menor que el de la suma de las bacteriocinas evaluadas individualmente. Por otro lado, las tres bacteriocinas combinadas mostraron frente a la mayoría de los microorganismos indicadores empleados una actividad antimicrobiana menor que la de sus combinaciones binarias con la EntL50A. Tras la evaluación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas tanto individualmente como combinadas, se observó que su coeficiente de sinergismo varió enormemente, entre un 0,1 y un 23,7, dependiendo del microorganismo indicador empleado (Tabla VI.2). No obstante, los resultados

obtenidos sugieren que *entJS* constituye el requerimiento mínimo para la producción del péptido EntJS biológicamente activo, así como que dicho péptido no requiere modificaciones post-traduccionales para manifestar su actividad antimicrobiana.

VII.4.4. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA JS (EntJS) POR *Pichia pastoris*

En este trabajo se ha evaluado la producción y expresión funcional del producto del gen *entJS* por *P. pastoris*, una levadura metilotrófica (Daly y Hearn, 2005; Ilgen y col., 2005) empleando como vector de expresión el plásmido pPICZ α A. La producción recombinante de péptidos antimicrobianos es una forma empírica de demostrar que el péptido evaluado es responsable de la actividad biológica observada (Swe y col., 2007). La producción de EntJS se determinó mediante un ensayo ELISA-NCI empleando anticuerpos policlonales de actividad predeterminada frente a la secuencia aminoacídica C-terminal de la EntL50B (Criado y col., 2006b), ya que, al ser idéntica la región aminoacídica C-terminal de EntL50B y EntJS, dichos anticuerpos anti-EntL50B deberían reconocer específicamente, y así lo hicieron, la EntJS (Tabla VI.3). Entre los derivados de *P. pastoris* X-33 que portaban el plásmido integrado pPICJ1, se seleccionó el clon *P. pastoris* X-33JS por su elevada actividad antimicrobiana manifestada en la prueba de siembra en picadura (resultados no mostrados). La producción heteróloga y actividad antimicrobiana de la EntJS producida por *P. pastoris* X-33JS se evaluó y cuantificó posteriormente mediante el empleo de técnicas de difusión en placas de agar (ADT) y por un ensayo inmunoenzimático no competitivo indirecto (ELISA-NCI). Los resultados obtenidos demostraron que, aunque *P. pastoris* X-33JS comenzó a producir EntJS tras 8 horas de incubación, los niveles más altos de producción de bacteriocina, actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica se registraron después de 192 horas de incubación de *P. pastoris* X-33JS en el medio complejo BMMY (Tabla VI.3). La purificación de la actividad antimicrobiana de *P. pastoris* X-33JS desarrollada en medio BMMY permitió un incremento de su actividad antimicrobiana específica de 26.420 veces y una recuperación de su actividad antimicrobiana inicial del 3% (Tabla VI.4). El análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS) de la actividad antimicrobiana purificada reveló la existencia de fragmentos de masas moleculares variables, lo que sugiere que la EntJS producida por *P. pastoris* X-33JS ha sido modificada, degradada proteolíticamente o no se encuentra purificada a homogeneidad.

VII.4.5. PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS SOBRENADANTES DE *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50

El empleo de anticuerpos policlonales de actividad predeterminada frente a EntL50A y EntL50B (Criado y col., 2006b) permitió la detección y cuantificación de EntL50A, EntL50B y EntJS en los sobrenadantes de *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50. La producción de bacteriocinas y la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50 desarrollados en MRS se muestran en la Tabla VI.5. Mientras *E. faecium* L50 produce las enterocinas EntL50A y EntL50B en cantidades similares, la producción de EntL50B en *E. faecalis* DBH18 fue 6,6 veces superior a la de *E. faecium* L50, aunque la producción de EntL50A por *E. faecalis* DBH18 resultó ser 2,2 veces inferior a la *E. faecium* L50. No obstante, *E. faecalis* DBH18 exhibió una actividad antimicrobiana 2,7 veces superior a la de *E. faecium* L50. La producción similar de EntL50A y EntL50B por *E. faecium* L50 sugiere que ambas

bacteriocinas se transcriben desde una misma unidad de transcripción (Cintas y col., 1998), mientras que la mayor producción de EntL50B (EntL50B + EntJS) por *E. faecalis* DBH18 puede atribuirse a una mayor producción de EntJS por este microorganismo (Tabla VI.5). Asimismo, los resultados obtenidos sugieren que la producción de EntJS no parece encontrarse transcripcionalmente asociada a la de los genes *entL50A-entL50B*. Una optimización de los códones responsables de la síntesis de aminoácidos así como del promotor y/o de la secuencia Shine-Dalgarno, podrían también ser responsables de la mayor producción de EntJS por *E. faecalis* DBH18. Actualmente se sabe que la sustitución de un único aminoácido puede determinar mayores o menores rendimientos de secreción de proteínas y péptidos en *Bacillus subtilis* (Nijland y col., 2007). Por tanto, es posible que las diferencias en la secuencia aminoacídica de EntJS respecto a la de EntL50B permitan una secreción más eficiente de la EntJS por *E. faecalis* DBH18. Del mismo modo, resulta interesante la observación de que *E. faecalis* DBH18 produce EntL50A, EntL50B y EntJS ya que estudios previos demostraron que *E. faecium* DCH2 y *E. faecium* DCC14, que codifican los genes *entL50A-entL50B* y *entA*, fueron silentes para la producción de EntL50A, EntL50B y enterocina A (Sánchez y col., 2007a).

En este trabajo también se ha evaluado la actividad antimicrobiana y espectro de inhibición de los sobrenadantes de *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50 frente diversas BAL y otras bacterias alterantes y patógenas de los alimentos (Tabla VI.6). La actividad antimicrobiana de *E. faecalis* DBH18 comparada con la de *E. faecium* L50 fue superior frente a los microorganismos indicadores de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Enterococcus*, pero no frente a los de los géneros *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Listeria* y *Staphylococcus*, lo que puede deberse a que la sensibilidad de los microorganismos indicadores frente a las distintas combinaciones de las enterocinas EntL50A, EntL50B y EntJS es variable (Tabla VI.2). Los resultados obtenidos sugieren, además, que la EntJS puede considerarse una variante bioquímica de interés en investigaciones sobre la repercusión de las sustituciones de aminoácidos en la actividad antimicrobiana, en el espectro antimicrobiano y en los efectos sinérgicos de las enterocinas. El plegamiento de los péptidos antimicrobianos, su diferente sensibilidad a las proteasas, la formación de agregados, la producción adicional de otras bacteriocinas y otros fenómenos todavía no bien evaluados que afecten a las características bioquímicas de las enterocinas, podrían también explicar la diferente actividad antimicrobiana de *E. faecalis* DBH18 comparada con la de *E. faecium* L50.

El trabajo realizado ha determinado que *E. faecalis* DBH18 codifica genes responsables de la producción de bacteriocinas en *E. faecalis* (ef1097) y *E. faecium* (*entL50A-entL50B*) de origen alimentario, clínico o medioambiental, lo que sugiere que algunas enterocinas se producen por enterococos no relacionados en cuanto a su especie y/o el origen de la cepa productora. Además, este trabajo también confirma que la producción de múltiples bacteriocinas puede ser un rasgo común de los enterococos (Nes y col., 2007). Sin embargo, ya que *E. faecalis* DBH18 codifica factores potenciales de virulencia (Sánchez y col., 2007a), dicho microorganismo puede ser objeto de preocupación por su potencial patogenicidad en personas inmunodeprimidas o con enfermedades subyacentes. El hallazgo de genes de virulencia de *E. faecalis* de origen alimentario exige una mayor valoración de las medidas de seguridad alimentaria (Lepage y col., 2007). En aras de unas buenas prácticas microbiológicas, debería evitarse la ingestión de alimentos que contengan enterococos con factores potenciales de virulencia y elevada actividad antimicrobiana y espectro de acción. Consecuentemente, sería recomendable que los ána-

reales y otras especies de caza menor se evisceraran y desplumaran con suficiente antelación a su consumo (Martín y col., 2006; Sánchez y col., 2007a). No obstante, algunas de las enterocinas evaluadas en este trabajo podrían encontrar posibles aplicaciones como agentes naturales antimicrobianos en alimentos y piensos y en otras aplicaciones farmacéuticas, veterinarias y médicas. Por ello, la evaluación de la producción, regulación, inmunidad, secreción y movilización de la enterocina Sec-dependiente EntV583 y de las enterocinas EntL50A, EntL50B y EntJS producidas por *E. faecalis* DBH18, constituye un interesante reto científico en salud pública, microbiología de los alimentos y en el área de trabajo de las bacteriocinas.

CAPÍTULO VIII
CONCLUSIONES

*CHAPTER VIII
CONCLUSIONS*

Primera. Del intestino y canales de ánades reales (*Anas platyrhynchos*) se han aislado, selectivamente, enterococos que se evaluaron por su actividad antimicrobiana, por la presencia de genes que codifican bacteriocinas y su expresión proteica, y por la presencia de genes que codifican factores potenciales de virulencia. De los enterococos con actividad antimicrobiana *Enterococcus faecalis* constituyó la especie mayoritaria, seguido de *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae* y otros *Enterococcus* spp. El gen *efaAfm* fue el único determinante de virulencia identificado en *E. faecium*, mientras los aislados de *E. faecalis* poseían un elevado número de factores de virulencia y los de *E. hirae* no mostraron ninguno de los determinantes de virulencia evaluados. Todos los *E. faecium* con actividad antimicrobiana codificaban genes productores de bacteriocinas, aunque su presencia no siempre se correlaciona con una mayor actividad antimicrobiana de sus sobrenadantes.

Segunda. *E. hirae* DCH5, aislado de ánades reales (*A. platyrhynchos*), produce una bacteriocina de 5.093,2 Da cuya estructura primaria se determinó mediante su secuenciación aminoacídica y nucleotídica. El análisis nucleotídico de un fragmento de 2.838-pb reveló la presencia de cinco marcos abiertos de lectura (ORFs). El primero, (*hirJM79*), codifica un péptido de 74 aminoácidos con un péptido señal de 30 aminoácidos seguido de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina madura, la hiracina JM79 (*HirJM79*), de 44 aminoácidos. El segundo (*hiriJM79*) codifica la hipotética proteína de inmunidad de *HirJM79*. Los ORFs posteriores codifican una hipotética proteína de movilización (*orfC*), una relaxasa/nucleasa de movilización (*orfD*), y otra proteína hipotética (*orfE*) de secuencia incompleta. La producción heteróloga de la *HirJM79* en otras bacterias lácticas (BAL) sugiere que *hirJM79* es el requerimiento mínimo para la producción de *HirJM79* biológicamente activa, que la *HirJM79* es secretada por la ruta general de secreción o sistema *sec*-dependiente, y que la *HirJM79* es, efectivamente, la proteína de inmunidad de la *HirJM79*.

Tercera. La construcción de vectores de expresión conteniendo el gen estructural de la *HirJM79* (*hirJM79*), con o sin su gen de inmunidad (*hiriJM79*), bajo el control de promotores constitutivos o inducibles, ha permitido la producción heteróloga de *HirJM79* biológicamente activa en los sobrenadantes de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* IL1403, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* NZ9000, *Lactobacillus sakei* Lb790, *E. faecalis* JH2-2 y en la levadura *Pichia pastoris* X-33, la coproducción de *HirJM79* y nisina A (*NisA*) en *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* DPC5598, y la coproducción de *HirJM79* y enterocina P (*EntP*) en *E. faecium* L50/14-2. Las bacterias lácticas (BAL) produjeron mayores cantidades de *HirJM79* que *E. hirae* DCH5, aunque la actividad antimicrobiana de la mayoría de los transformantes fue menor que la esperada en base a su producción de *HirJM79*. La síntesis, procesamiento y secreción de *HirJM79* es eficaz tanto en las BAL evaluadas como en *P. pastoris*.

Cuarta. *E. faecalis* DBH18, aislado de ánades reales (*A. platyrhynchos*), codifica los genes *ef1097*, *entL50A-entL50B* y otro similar al *entL50B*, denominado *entJS*. Los genes *entL50A-entL50B* son idénticos en *E. faecalis* DBH18 y *E. faecium* L50 aunque parecen mostrar una localización diferente en ambos microorganismos. La secuenciación de fragmentos génicos de *E. faecalis* DBH18, conteniendo *entJS*, reveló la existencia de tres hipotéticos marcos de lectura abiertos (ORFs). El primero, (*entJS*), codifica un péptido de 43 aminoácidos de una masa molecular teórica de 5.182,2 Da. El segundo (*orfB*) codifica un péptido de 89 aminoácidos de una masa molecular teórica de 10.636,2 Da y, el último (*orfC*) codifica otra proteína de 89

aminoácidos de una masa molecular teórica de 10.552,8 Da. La evaluación de la actividad antimicrobiana del producto de *entJS*, obtenido mediante experiencias de transcripción/traslación *in vitro* así como mediante su producción heteróloga en *P. pastoris*, sugieren que *entJS* es responsable de la producción y expresión funcional del péptido antimicrobiano enterocina JS (EntJS).

First. Samples from the intestinal content and carcasses of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) were evaluated for enterococci with antimicrobial activity, presence of genes coding bacteriocins and their expression, and potential virulence factors. *Enterococcus faecalis* comprised the largest enterococcal species with antagonistic activity followed by *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, and other *Enterococcus* spp. The *efaAfm* determinant was the only virulence gene detected in *E. faecium*, while *E. faecalis* showed a larger number of virulence determinants, and *E. hirae* did not carry any of the virulence genes examined. All *E. faecium* isolates with antagonistic activity encoded bacteriocins, although the occurrence in the isolates of several enterocin genes did not always correlate with a higher antimicrobial activity in their supernatants.

Second. *E. hirae* DCH5, isolated from mallard ducks (*A. platyrhynchos*), produces a bacteriocin of 5,093.2 Da. The primary structure of the bacteriocin was determined by combined amino acid and DNA sequencing. Nucleotide analysis of a 2,838-bp DNA fragment of *E. hirae* DCH5 revealed five putative open reading frames (ORFs). The first *orf* (*hirJM79*) encodes a 74-amino-acid peptide with an N-terminal signal peptide of 30 amino acids, followed by the amino acid sequence of the mature bacteriocin, hircin JM79 (HirJM79), of 44 amino acids. The second *orf* (*hiriJM79*) encodes the putative immunity protein of HirJM79. Contiguous ORFs encode a putative mobilization protein (*orfC*), a relaxase/mobilization nuclease domain (*orfD*), and an incomplete hypothetical protein (*orfE*). The production of HirJM79 by heterologous hosts suggest that *hirJM79* is the minimum requirement for production of biologically active HirJM79, that HirJM79 is most likely externalized by the general secretory pathway or Sec-dependent pathway, and that HiriJM79 is the immunity protein for HirJM79.

Third. The construction of expression vectors containing the HirJM79 structural gene (*hirJM79*), with or without the HirJM79 immunity gene (*hiriJM79*), under the control of constitutive or inducible promoters, has permitted the production of biologically active HirJM79 in the supernatants of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000, *Lactobacillus sakei* 790, *E. faecalis* JH2-2, and *P. pastoris* X-33, the coproduction of HirJM79 and nisin A (NisA) in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DPC5598, and the coproduction of HirJM79 and enterocin P (EntP) in *E. faecium* L50/14-2. All lactic acid bacteria (LAB) produced larger quantities of HirJM79 than *E. hirae* DCH5, although the antimicrobial activity of most transformants was lower than predicted from their production of HirJM79. The synthesis, processing, and secretion of HirJM79 proceeds efficiently in the LAB strains and *P. pastoris*.

Fourth. *E. faecalis* DBH18, isolated from mallard ducks (*A. platyrhynchos*), encodes *ef1097*, *entL50A-entL50B* and an *entL50B*-like gene, termed *entJS*. The *entL50A-entL50B* sequence was identical in *E. faecalis* DBH18 and in *E. faecium* L50 although both genes may be located in a different genetic locus in these microorganisms. The sequencing of genomic fragments containing *entJS* from *E. faecalis* DBH18 revealed three putative open reading frames (ORFs). The first *orf* (*entJS*) encodes a predicted 43-amino-acid peptide of 5,182.2 Da, the second (*orfB*) encodes a predicted 89-amino-acid protein of 10,636.2 Da, and the third (*orfC*) encodes a predicted 89-amino-acid protein of 10,552.8 Da. The evaluation of the antimicrobial activity of the *entJS* product obtained by an *in vitro* combined transcription/translation assay and its heterologous production by *Pichia pastoris*, suggest that *entJS* is responsible for the production and biological expression of the antimicrobial peptide enterocin JS (EntJS).

CAPÍTULO IX

TRABAJO FUTURO

Como se ha descrito en otras secciones de este trabajo, en los enterococos de origen alimentario resulta aconsejable determinar la correlación entre su potencial higiénico (producción de bacteriocinas) y seguridad (factores de virulencia), así como evaluar aquellos nichos ecológicos que faciliten el aislamiento de enterococos productores de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) útiles como conservadores naturales de los alimentos o que puedan permitir su empleo como cultivos iniciadores, protectores o probióticos. De los resultados obtenidos en este trabajo conviene destacar el aislamiento e identificación de *E. faecalis* con una potente actividad antimicrobiana directa y un amplio espectro de acción frente a los microorganismos indicadores evaluados, pero cuyos sobrenadantes libres de células no manifiestan actividad antimicrobiana frente a ninguno de ellos. Uno de los objetivos de trabajo futuro debería recaer en la caracterización bioquímica y genética de la(s) sustancia(s) antimicrobiana(s) responsable(s) de su actividad antimicrobiana, no descartando la existencia de compuestos de naturaleza no proteica o de moléculas peptídicas de pequeño tamaño molecular, todavía desconocidas. Resulta también interesante que, excepto las especies *E. faecalis* y *E. faecium*, ninguna de las otras especies de enterococos codifique ninguno de los factores potenciales de virulencia evaluados. Es posible que los resultados se deban a diferencias en la secuencia nucleotídica de los genes evaluados más que a la ausencia de genes responsables de virulencia, lo cual constituye otra área de trabajo de interés dentro de los enterococos.

La experiencia adquirida en el aislamiento y caracterización de enterococos bacteriocinogénicos aislados de ánades reales (*Anas platyrhynchos*) ha sido interesante, fructífera y positiva por cuanto permite aconsejar medidas higiénicas a realizar en canales de ánades reales obtenidas de la caza y distribuidas para el consumo humano. La evaluación de otros nichos ecológicos de origen alimentario, veterinario, humano, clínico o ambiental puede conducir, igualmente, al aislamiento e identificación de enterococos u otras bacterias lácticas (BAL) bacteriocinogénicas, de interés para su evaluación y estudio como productores de péptidos antimicrobianos útiles en la industria alimentaria, farmacéutica y veterinaria y en otras aplicaciones médicas o para su empleo como cultivos iniciadores, protectores o probióticos.

De interés en este trabajo ha sido la caracterización bioquímica y genética de la bacteriocina hiracina JM79 (HirJM79), producida por *E. hirae* DCH5. Pero, igualmente y sin duda, de gran interés científico y aplicado será también la caracterización bioquímica y genética del péptido antimicrobiano de 6.022 Da producido por *Lactococcus garvieae* DCC43, aislado de ánades reales (*Anas platyrhynchos*) durante el aislamiento selectivo de los enterococos lo que, por otra parte, confirma que los medios selectivos, actualmente disponibles para el aislamiento y selección de los enterococos, no son lo eficaces que deberían ser. La producción de bacteriocinas en *L. garvieae* no es inédita pero tampoco común, ya que solamente se ha descrito la producción de una bacteriocina, garviecina L1-5 de una masa molecular de unos 2,5 kDa, producida por *L. garvieae* L1-5 aislado de leche de vaca (Villani y col., 2001). Por otra parte, *L. garvieae* es un patógeno emergente de la acuicultura continental, especialmente para la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), donde se considera el agente causal de la lactococosis de las truchas y de otras especies de peces cultivados (Vendrell y col., 2007), aunque también forma parte de la flora microbiana de diversos alimentos y se aísla de otras muchas especies animales (Rantsiou y col., 2005). Cabe la posibilidad de que el péptido antimicrobiano producido por *L. garvieae* DCC43 fuese una bacteriocina todavía no descrita y, quizás útil, para prevenir o combatir la lactococosis de los peces de acuicultura ya que las bacteriocinas suelen ser más

activas frente a cepas la misma especie y frente a especies fiogenéticamente próximas a la cepa productora.

Respecto a la producción heteróloga de la HirJM79, producida por *E. hirae* DCH5, por cepas hospedadoras de *L. lactis*, *Lb. sakei*, *E. faecium* y *E. faecalis*, sus niveles de producción varían según la cepa hospedadora, el sistema de expresión (inducible o constitutivo) y el vector de expresión. Por ello, otro de los objetivos de trabajo futuro debería ser el de evaluar en éstos y otros hospedadores la utilización de otros vectores de expresión con un mayor número de copias o de promotores más activos, funcionales en un mayor número de hospedadores o eficaces en hospedadores productores de otras bacteriocinas. También debería realizarse un mayor esfuerzo investigador para el empleo y/o diseño de vectores de expresión de “grado alimentario”. Finalmente, no debe olvidarse que aunque la producción de HirJM79 por las BAL evaluadas es mayor que por *E. hirae* DCH5, su actividad antimicrobiana específica es menor, por lo que deberían explorarse otras metodologías de biología molecular que faciliten la recuperación o incremento de la actividad antimicrobiana de la HirJM79 producida por las BAL de interés. Asimismo, los buenos resultados de producción y expresión funcional de la HirJM79 en los hospedadores empleados, debería utilizarse como punto de partida para su producción en otras BAL adaptadas a sustratos alimentarios de origen cárnico, lácteo y vegetal, así como para su posible empleo como cultivos protectores y probióticos en los piensos para animales. Por otra parte, para futuras aplicaciones biotecnológicas de la bacteriocina JM79, producida por *E. hirae* DCH5, por otras BAL o por *P. pastoris* y para su empleo como péptido antimicrobiano natural o ingrediente alimentario deberían investigarse y desarrollarse protocolos de recuperación y de purificación de la bacteriocina más eficaces que los disponibles actualmente hasta alcanzar rendimientos que permitan su producción y recuperación a escala industrial y, económicamente, sean más rentables.

Igualmente, el que la HirJM79, producida por *E. hirae* DCH5, sea una bacteriocina Sec-dependiente con una extensión N-terminal del tipo péptido señal, así como el haber conseguido su producción en otras BAL mediante el empleo de su ruta general de secreción o sistema Sec-dependiente, puede permitir la producción de otras bacteriocinas y péptidos activos de interés en la industria alimentaria mediante la fusión de la secuencia nucleotídica de la bacteriocina madura o del péptido bioactivo al péptido señal de la HirJM79 (PS_{HirJM79}), lo que daría lugar a quimeras génicas que podrían permitir la clonación, producción y expresión funcional de las bacteriocinas o péptidos bioactivos de interés en otras BAL. Entre los péptidos bioactivos de interés para ser producidos por BAL destacan aquéllos con propiedades biotecnológicas que incluyen: (i) su actividad antimicrobiana y amplio espectro de acción frente a bacterias, virus, hongos y parásitos; (ii) su naturaleza antigénica, capaz de desarrollar una respuesta inmune protectora frente a los microorganismos que los poseen o producen; (iii) su participación en la modulación de la respuesta celular a procesos inflamatorios e inmunológicos; y (iv) su capacidad de reducir la tensión arterial. De esta manera las BAL hospedadoras podrían convertirse en “factorías celulares” de producción de péptidos bioactivos útiles en la producción de “alimentos funcionales”, es decir, de alimentos con un efecto fisiológico beneficioso más allá del derivado de su valor nutritivo.

De interés en este trabajo ha sido también determinar que *E. faecalis* DBH18, aislado de ánades reales, codifica factores potenciales de virulencia pero también la bacteriocina Sec-

dependiente EntV583 y las enterocinas EntL50, EntL50B y EntJS, lo que sugiere que *E. faecalis* DBH18 codifica múltiples bacteriocinas cuya secuencia nucleotídica y actividad antimicrobiana parece no limitarse a especies determinadas de enterococos ni al origen alimentario, clínico o ambiental de los enterococos que las codifican. Por ello, de gran interés científico sería determinar la secuencia nucleotídica adyacente al fragmento *entL50A-entL50B*, la localización exacta del fragmento citado en *E. faecium* L50 y *E. faecalis* DBH18, la localización de *entL50A-entL50B* respecto de *entJS* en *E. faecalis* DBH18 y la determinación de la secuencia nucleotídica adyacente a *entJS*. Así mismo, ya que las bacteriocinas producidas por *E. faecalis* DBH18 pueden encontrar aplicaciones como péptidos antimicrobianos naturales en la industria alimentaria, farmacéutica y veterinaria, así como en diversas aplicaciones médicas, de gran interés será el desarrollo de experiencias que determinen la regulación, procesamiento, secreción y producción de las bacteriocinas producidas por *E. faecalis* DBH18. Dichas experiencias y sus posibles resultados son de gran interés científico y aplicado en microbiología de los alimentos, en salud pública y en el área de trabajo de las bacteriocinas.

CAPÍTULO X

BIBLIOGRAFÍA

Achemchem F., M. Martínez-Bueno, J. Abrini, E. Valdivia y M. Maqueda (2005). *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. J. Appl. Microbiol., 99: 141-150.

Aguirre, M. y M.D. Collins (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. J. Appl. Bacteriol., 75: 95-107.

Allison, G.E., C. Ahn, M.E. Stiles y T.R. Klaenhammer (1995a). Utilization of the leucocin A export system in *Leuconostoc gelidum* for production of a *Lactobacillus* bacteriocin. FEMS Microbiol. Lett., 131: 87-93.

Allison, G.E., R.W. Worobo, M.E. Stiles y T.R. Klaenhammer (1995b). Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. Appl. Environ. Microbiol., 61: 1371-1377.

Altschul S.F., T.L. Madden, A.A Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D.J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402.

Anderssen, E.L., D.B. Diep, I.F. Nes, V.G.H. Eijsink y J. Nissen-Meyer (1998). Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. Appl. Environ. Microbiol., 64: 2269-2272.

Arkowitz, R.A. y W. Wickner (1994). SecD and SecF are required for the proton electrochemical gradient stimulation of preprotein translocation. EMBO J., 13: 954-963.

Arqués, J., E. Rodríguez, J. Tomillo, P. Gaya, M. Núñez y M. Medina (2003). Tratamientos combinados de altas presiones y bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en la inactivación de patógenos. En: Bacteriocinas de bacterias lácticas en la mejora de la calidad de los alimentos, pp. 181-192. Medina, M. y M. Núñez. INIA, Madrid.

Aukrust T.W., M.B. Brurberg y I.F. Nes (1995). Transformation of lactobacilli by electroporation. Methods Mol. Biol., 47: 201-208.

Axelsson, L (1998a). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En "Lactic Acid Bacteria", pp. 1-72. Salminen, S. y A. Von Wright (eds.). Marcel Dekker Inc., Nueva York.

Axelsson, L., T. Katla, M. Bjornslett, V.G.H. Eijsink y A. Holck (1998b). A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sakei*. FEMS Microbiol. Lett., 168: 137-143.

Axelsson, L., G. Lindstad y K. Naterstad (2003). Development of an inducible gene expression system for *Lactobacillus sakei*. Lett. Appl. Microbiol., 37: 115-120.

Aymerich, T., H. Holo, L.S. Håvarstein, M. Hugas, M. Garriga e I.F. Nes (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol., 62: 1676-1682.

Aymerich, M.T. y M. Hugas (1998). Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. Eurocarne, 72: 39-49.

Balla, E., L.M.T. Dicks, M. du Toit, M.J. van der Merwe y W.H. Holzapfel (2000). Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. Appl. Environ. Microbiol., 66: 1298-1304.

Balla E. y L.M.T. Dicks (2005). Molecular analysis of the gene cluster involved in the production and secretion of enterocins 1071A and 1071B and of the genes responsible for the replication and transfer of plasmid pEF1071. Int. J. Food Microbiol., 99: 33-45.

Batdorj, B., M. Dalgarrondo, Y. Choiset, J. Pedroche, F. Métro, H. Prévost, J.M. Chobert y T. Hartle (2006). Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. J. Appl. Microbiol., 101: 837-848.

Bauer, R. y L.M.T. Dicks (2005). Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. Int. J. Food Microbiol., 101: 201-216.

Beaulieu, L., D. Groleau, C.B. Míguez, J.F. Jetté, H. Aomari y M. Subirade (2005). Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. Prot. Expr. Purif., 43: 111-125.

Bellomo, G., A. Mangiagale, L. Nicastro y G. Frigerio (1980). A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. Current Therapy and Research, 28: 927-936.

BenOmar, N., A. Castro, R. Lucas, H. Abriouel, N.M.K. Yousif, C.M.A.P. Franz, W.H. Holzapfel, R. Pérez, M. Martínez y A. Gálvez(2004). Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. Syst. Appl. Microbiol., 27: 118-130.

Benyacoub, J., G.L. Czarnecki-Maulden, C. Cavadini, T. Sauthier, R.E. Anderson, E.J. Schiffrin y T. von der Weid (2003). Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune function in young dogs. J. Nutr., 133: 1158-1162.

Berjeaud J.M. y Y. Cenatiempo (2004). Purification of antilisterial bacteriocins. Methods Mol. Biol., 268: 225-233.

Biet, F., J.M. Berjeaud, R.W. Worobo, Y. Cenatiempo y C. Fremaux (1998). Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. Microbiol., 144: 2845-2854.

Biswas, S. R., P. Ray, M. C. Johnson y B. Ray (1991). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin Ach, by *Pediococcus acidilactici* H. Appl. Environ. Microbiol., 57: 1265-1267.

Bohaychuk, V.M., C.M.A.P. Franz, M.J. Van Belkum, M.E. Stiles, y L.M. McMullen (1999). Heterologous expression of brochocin-C in *Carnobacterium* spp. Abstracts of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, FEMS, Veldhoven, Holanda, C86.

Bonten, M.J.M., R. Willems y R.A. Weinstein (2001). Vancomycin resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? Lancet. Infect. Dis., 1: 314-325.

Borgen, K., G.S. Simonsen, A. Sundsfjord, Y. Wasteson, O. Olsvik y H. Kruse (2000). Continuing high prevalence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned. J. Appl. Microbiol., 89: 478-485.

Borgen, K., M. Sørum, Y. Wasteson y H. Kruse (2001). VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. Int. J. Food Microbiol., 64: 89-94.

Bourgogne, A., S.G. Hilsenbeck, G.M. Dunny y B.E. Murray (2006). Comparaison of OG1RF and a isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the Fsr system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. J. Bacteriol., 188: 2875-2884.

Brede, D.A., T. Faye, M.P. Stierli, G. Dasen, A. Theiler, I.F. Nes, L. Meile y H. Holo (2005). Heterologous production of antimicrobial peptides in *Propionibacterium freudenreichii*. Appl. Environ. Microbiol., 71: 8077-8084.

Broadbent, J.R., W.E. Sandina y J.K. Kondo (1995). Characteristics of Tn5307 exchange and intergenic transfer of genes associated with nisin production. Appl. Environ. Biotechnol., 44: 139-146.

Brock, T.D. y J.M. Davies (1963). Probable identity of a group D hemolysin with a bacteriocin. J. Bacteriol., 134: 229-236.

Budzik, J.M. y O. Schneewind (2006). Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis. J. Clin. Invest., 116: 2582-2584.

Busani, L., M. del Grosso, C. Paladini, C. Graziani, A. Pantosti, F. Biavasco y A. Caprioli (2004). Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and -resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. Int. J. Food Microbiol., 97: 17-22.

Buydens, P. y S. Debeuckelaere (1996). Efficacy of SF68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 31: 887-891.

Carvalho, Mda.G., A.G. Steigerwalt, R.E. Morey, P.L. Shewmaker, L.M. Teixeira y R.R. Facklam (2004). Characterization of three new enterococcal species, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E1, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E2, and *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E3, isolated from human clinical specimens. J. Clin. Microbiol., 42: 1192-1198.

Carvalho, Mda.G., P.L. Shewmaker, A.G. Steigerwalt, R.E. Morey, A.J. Sampson, K. Joyce, T.J. Barrett, L.M. Teixeira y R.R. Facklam (2006). *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **56**: 1505-1508.

Casaus, P., T. Nilsen, L.M. Cintas, I.F. Nes, P.E. Hernández y H. Holo (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiol., **143**: 2287-2294.

Casaus, M.P. (1998). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium* T136. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Cereghino, J.L. y J.M. Cregg (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol. Rev., **24**: 45-66.

Cereghino, G. P. L., J. L. Cereghino, C. Ilgen y J. M. Cregg (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Curr. Opin. Biotechnol., **13**: 329-332.

Chen, Y., R.D. Ludescher y T.J. Montville (1997). Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. Appl. Environ. Microbiol., **63**: 4770-4777.

Chikindas, M.L., K. Venema, A.M. Ledeboer, G. Venema y J. Kok (1995). Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. Lett. Appl. Microbiol., **21**: 183-189.

Chopin M.C., A. Chopin, A. Moillo-Bott y P. Langella (1984). Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. Plasmid, **11**: 260-263.

Chow, J.W., L.A. Thal, M.B. Perri, J.A. Vázquez, S.M. Donabedian, D.B. Clewell y M.J. Zervos. (1993). Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. Antimicrob. Agents Chemother., **37**: 2474-2477.

Cintas, L.M., M.P. Casaus, L.S. Håvarstein, P.E. Hernández e I.F. Nes (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl. Environ. Microbiol., **63**: 4321-4330.

Cintas, L.M. y P. Casaus (1998). La necesidad de conservar los alimentos. Alimentación, Equipos y Tecnología, **10**: 89-95.

Cintas, L.M., P. Casaus, H. Holo, P.E. Hernández, I.F. Nes y L.S. Håvarstein (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. J. Bacteriol., **180**: 1988-1994.

Cintas, L.M., P. Casaus y P.E. Hernández (2000a). Bacterias lácticas de origen alimentario: consideraciones taxonómicas y filogenéticas. Alimentaria. Diciembre, pp. 61-70.

Cintas, L.M., P. Casaus y P.E. Hernández (2000b). Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas. Alimentación, Equipos y Tecnología (Leche y productos lácteos). Septiembre, pp. 83-119.

Cintas, L.M., P. Casaus, C. Herranz, L.S. Håvarstein, H. Holo, P.E. Hernández e I.F. Nes (2000c). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. J. Bacteriol., **182**: 6806-6814.

Cintas, L.M., M.P. Casaus, C. Herranz, I.F. Nes y P.E. Hernández (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Food Sci. Tech. Int., **7**: 281-305.

Citti, R. (2005). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de leches y quesos de búfalas de Venezuela: actividad antimicrobiana y caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes y M.L. Chikindas (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol., **71**: 1-20.

Coburn, P.S. y M.S. Gilmore (2003). The *E. faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukariotic and prokaryotic cells. Cell Microbiol., **5**: 661-669.

Coburn, P.S., C.M. Pillar, B.D. Jett, W. Haas y M. Gilmore (2004). *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin. Science, **306**: 2270-2272.

Coburn, P.S., A.S. Baghdayan, G.T. Dolan y N. Shankar (2007). Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. Mol. Microbiol., **63**: 530-544.

Cocconcelli, P.S., D. Cattivelli y S. Gazzola (2003). Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. Int. J. Food Microbiol., **88**: 315-323.

Coderre, P.E. y G.A. Somkuti (1999). Cloning and expression of the pediocin operon in *Streptococcus thermophilus* and other lactic fermentation bacteria. Curr. Microbiol., **39**: 295-301.

Coque, T.M., R. Willems, R. Canton, R. del Campo y F. Baquero (2002). High occurrence of *esp* among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. J. Antimicrob. Chemother., **50**: 1035-1038.

Cortes-Perez, N.G., I. Poquet, M. Oliveira, J. J. Gratadoux, S.M. Madsen, A. Miyoshi, G. Corthier, V. Azevedo, P. Langella y L.G. Bermúdez-Humarán (2006). Construction and characterization of a *Lactococcus lactis* strain deficient in intracellular ClpP and extracellular HtrA proteases. Microbiol., **152**: 2611-2618.

Cotter, P.D., C. Hill y R.P. Ross (2005a). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Rev. Microbiol., **3**: 777-788.

Cotter, P. D., C. Hill, y R.P. Ross (2005b). Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. Curr. Protein Pept. Sci., **6**: 61-75.

Clewell, D.B. (1993). Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. Cell, **73**: 9-12.

Cregg, J.M., T. S. Vedvick y W.C. Raschke (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Bio/Technol., **11**: 905-910.

Criado, R., D.B. Diep, A. Aakra, J. Gutiérrez, I.F. Nes, P.E. Hernández y L.M. Cintas (2006a). Complete sequence of the enterocin Q encoding plasmid pClZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. Appl. Environ. Microbiol., **72**: 6653-6666.

Criado, R., J. Gutiérrez, M. Martín, C. Herranz, P.E. Hernández y L.M. Cintas (2006b). Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. Appl. Environ. Microbiol., **72**: 7634-7643.

Daly, R. y M.T.W. Hearn (2005). "Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production". J. Mol. Recognit., **18**: 119-138.

Dargere, S., M. Vergnaud, R. Verdon, E. Saloux, O. Le Page, R. Leclercq y C. Bazin (2002). *Enterococcus gallinarum* endocarditis occurring on native heart valves. J. Clin. Microbiol., **40**: 2308-2310.

Dassa, E. y P. Bouige (2001). The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. Res. Microbiol., **152**: 211-219.

Deegan, L.H., P.D. Cotter, C. Hill y P. Ross (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J., **16**: 1058-1071.

De Graef, E.M., L.A. Devriese, M. Vancanneyt, M. Baele, M.D. Collins, K. Lefebvre, J. Swings y F. Haesebrouck (2003). Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al 2001. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **53**: 1069-1074. Erratum en Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **54**: 1423 (2004).

De Kwaadsteniet M., T. Fraser, C.A. Van Reenen y L.M.T. Dicks (2006). Bacteriocin T8, a novel Class IIa sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. Appl. Environ. Microbiol., **72**: 4761-4766.

- Del Campo R., C. Tenorio, R. Jiménez, C. Rubio, R. Gómez-Lus, F. Baquero y C. Torres (2001). Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. Antimicrob. Agents Chemother., 45: 905-912.
- Dellaglio, F., L.M.T. Dicks y S. Torriani (1995). The genus *Leuconostoc*. In The Genera of Lactic Acid Bacteria, pp. 235-278. Edited by B. J. B. Wood & W. H. Holzapfel. London: Blackie Academic & Professional.
- De Vos, W.M. (1987). Gene cloning and expression in lactic streptococci. FEMS Microbiol. Rev., 46: 281-295.
- De Vos, W.M. (1999). Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria. Int. Dairy J., 9: 3-10.
- De Vuyst, L., M.R. Foulquie y H. Reverts (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. Int. J. Food Microbiol., 84: 299-318
- De Vuyst, L., L. Avonts y E. Makras (2004). Probiotics, prebiotics and gut health (Chap. 17). Remacle, C., Reusens B. (Eds.), Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, United Kingdom, pp. 416-482.
- Devlieghere, F., L. Vermeiren y J. Debevere (2004). New preservation technologies: possibilities and limitations. Int. Dairy J., 14: 273-285.
- Devriese, L.A., B. Pot y M.D. Collins (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. J. Appl. Bacteriol., 75: 399-408.
- Devriese, L.A. y B. Pot (1995). The genus *Enterococcus*. En "The Genera of Lactic Acid Bacteria", Vol. 2, pp. 327-367. Wood, B.J.B. y W.H. Holzapfel. (eds.). Blackie Academic and Professional, Londres.
- Diep, D.B., L.S. Håvarstein e I.F. Nes (1996). Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. J. Bacteriol., 178: 4472-4483.
- Diep, D.B., L. Axelsson, C. Grefslí y I.F. Nes (2000). The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. Microbiology, 146: 2155-2160.
- Diep, D.B. e I.F. Nes (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. Curr. Drug Targets, 3: 107-122.
- Diep, D.B., M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo y I.F. Nes (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. P.N.A.S., 104: 2384-2389.

- Dieye, Y., A.J.W. Hoekman, F. Clier, V. Juillard, H.J. Boot y J.C. Piard (2003). Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigens: a crucial step for development of live vaccines. Appl. Environ. Microbiol., 69: 7281-7288.
- Doi, K., T. Eguchi, S.H. Choi, A. Iwatake, S. Ohmomo y S. Ogata (2002). Isolation of enterocin SE-K4-encoding plasmid and a high enterocin SE-K4 producing strain of *Enterococcus faecalis* K-4. J. Biosci. Bioeng., 93: 434-436.
- Domig, K.J., H.K. Mayer y W. Kneifel (2003). Methods used for isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. Int. J. Food Microbiol., 88: 165-188.
- Donelli, G., C. Paoletti, L. Baldassarri, E. Guaglianone, R. di Rosa, G. Magi, C. Spinaci y B. Facinelli (2004). Sex pheromone response, clumping, and slime production in enterococcal strains isolated from occluded biliary stents. J. Clin. Microbiol., 42: 3419-3427.
- Donnelly, C.W. (1994). *Listeria monocytogenes*. En "Foodborne Disease Handbook", vol 1, pp. 215-250. Huym, Y.H., R.K. Graham, K.D. Murrell y O.D. Cliver (eds.). Macel Dekker, Inc. Nueva York, (EEUU).
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis., 8: 881-890.
- Donlan, R.M. y J.W. Costerton (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev., 15: 167-193.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Héchard, L.M. McMullen y H. Prévost (2006). The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 70: 564-582.
- Driessen, A.J.M., P. Fekkes y J.P.W. Van der wolk (1998). The sec system. Curr. Biol., 1: 216-222.
- Driessen, A.J.M, C. van der Does y N. Nouwen (2002). Bacterial protein secretion and targeting. En: "Biopolymers", Volume 7, pp. 227-259. Polyamides and Complex Proteinaceous Materials I, Fahnestock, S. y A. Steinbüchel (eds.). Wiley-VCH, Nueva York (EE.UU.)
- Driessen, A.J.M y C. van der Does (2002). Protein export in bacteria. En: Protein Targeting, Transport and Translocation, pp. 47-73. Dalbey, R.E. y G. von Heijne (eds.). Academic Press, Londres (R.U.)
- Driessen, A.J.M. y N. Nouwen (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. Annu. Rev. Biochem., 77: 1-25.
- Duong, F. y W. Wickner (1997). The SecDFYajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. EMBO J., 16: 4871-4879.

- Dupont, H., P. Montravers, J. Mohler y C. Carbon (1998). Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. Infect. Immun., **66**: 2570-2575.
- Dutka-Malen, S., S. Evers y P. Courvalin (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J. Clin. Microbiol., **33**: 24-27. Erratum, **33**, 1434.
- Du Toit, M., C.M.A.P. Franz, L.M.T. Dicks y W.H. Holzapfel (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. J. Appl. Microbiol., **88**: 482-494.
- Eaton, T.J. y M.J. Gasson (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl. Environ. Microbiol., **67**: 1628-1635.
- Eaton, T.J. y M.J. Gasson (2002). A variant enterococcal surface protein Esp_{fm} in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. FEMS Microbiol. Let., **216**: 269-275.
- EFSA (2007). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. The EFSA Journal, **587**: 1-16.
- Eguchi, T.K. Kaminaka, J. Shima, S. Kawamoto, K. Mori, S.H. Choy, K. Doi, S. Ohmomo y S. Ogata (2001). Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. Biosci. Biotech. Biochem., **65**: 247-253.
- Eijsink, V.G.H., M. Skeie, M. Middelhoven, P.H. Brurberg e I.F. Nes (1998). Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **64**: 3275-3281.
- Eijsink, V.G.H., L. Axelsson, D.B. Diep, L.S. Håvarstein, H. Holo e I.F. Nes (2002). Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. Antonie van Leeuwenhoek, **81**: 639-654.
- Engelbert, M., E. Mylonakis, F.M. Ausubel, S.B. Calderwood y M.S. Gilmore (2004). Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. Infect. Immun., **72**: 3628-3633.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto y A. Ishizaki (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol. Rev., **24**: 85-106.
- European Commission, 2004. List of the authorized additives in feedingstuffs published in application of Article 9t (b) of Council Directive 70/524/EEC concerning additives feedingstuffs. Official Journal of the European Union of 25.2.2004, C50.

Fath, M. y R. Kolter (1993). ABC transporters: Bacterial exporters. Microbiol. Rev., 57: 995-1017.

Faye, T., D.A. Brede, T. Langsrud, I. F. Nes y H. Holo (2002). An antimicrobial peptide is produced by extracellular processing of a protein from *Propionibacterium jensenii*. J. Bacteriol., 184: 3649-3656.

Fekkes, P. y A.J.M. Driessen (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 63: 161-173.

Fernández, A., N. Horn, M.J. Gasson, H.M. Dodd y J.M. Rodríguez (2004). High-level coproduction of bacteriocins nisin A and lactococcin A by *Lactococcus lactis*. J. Dairy Res., 71: 1-6.

Fernández, L.A. y V. de Lorenzo (2001). Formation of disulphide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway. Mol. Microbiol., 40: 332-346.

Fimland, G., O.R. Blingsmo, K. Sletten, G. Jung, I.F. Nes y J. Nissen-Meyer (1996). New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. Appl. Environ. Microbiol., 62: 3313-3318.

Fimland, G., R. Jack, G. Jung, I.F. Nes y J. Nissen-Meyer (1998). The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a near 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the C terminus. Appl. Environ. Microbiol., 64: 5057-5060.

Fimland, G., L. Johnsen, L. Axelsson, M.B. Brurberg, I.F. Nes, V.G.H. Eijsink y J. Nissen-Meyer (2000). A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. J. Bacteriol., 182: 2643-2648.

Fimland, G., V.G.H. Eijsink y J. Nissen-Meyer (2002). Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. Microbiol., 148: 3661-3670.

Fimland, G., L. Johnsen, B. Dalhus, y J. Nissen-Meyer (2005). Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. J. Pept. Sci., 11: 688-696.

Floriano, B., J.L. Ruíz-Barba y R. Jiménez-Díaz (1998). Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol., 64: 4883-4890.

Flynn, S., D. Van Sinderen, G.M. Thornton, H. Holo, I.F. Nes y J.K. Collins (2002). Characterization of the genetic locus responsible for the production of a ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. Microbiol., 148: 973-984.

Fortina, M.G., G. Ricci, D. Mora y P.L. Manachini (2004). Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **54**: 1717-1721.

Foulquié-Moreno, M.R., R. Callawaert, B. Devreese, J. Van Beeumen y L. De Vuyst (2003). Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. J. Appl. Microbiol., **94**: 214-229.

Foulquié-Moreno, M.R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou y L. De Vuyst (2005). The role and application of enterococci in food and health. Int. J. Food Microbiol., **106**: 1-24.

Foulquié-Moreno, M.R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou y L. De Vuyst (2006). The role and application of enterococci in food and health. Int. J. Food Microbiol., **106**: 1-24.

Francia M.V., A. Varsaki, M.P. Garcillán-Barcia, A. Latorre, C. Drainas y F. de la Cruz (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. FEMS Microbiol. Rev., **28**: 79-100.

Franke, C.M. (1998). Topology of a type I secretion system for bacteriocins of *Lactococcus lactis*. Tesis doctoral. Universidad de Groningen. Holanda

Franz, C.M.P.A., W.H. Holzapfel y M.E. Stiles (1999a). Enterococci at the crossroads of food safety?. Int. J. Food Microbiol., **47**: 1-24.

Franz, C.M.P.A., R.W. Worobo, L.E.N. Quadri, U. Schillinger, W.H. Holzapfel, J.C. Vederas y M.E. Stiles (1999b). Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. Appl. Environ. Microbiol., **65**: 2170-2178.

Franz, C.M.P.A., M.J. van Belkum, R.W. Worobo, J.C. Vederas y M.E. Stiles (2000). Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross-protection to enterocin B. Microbiol., **146**: 621-631.

Franz, C.M.P.A., A.B. Muscholl-Silberhorn, N.M.K. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings y W.H. Holzapfel (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. Appl. Environ. Microbiol., **67**: 4385-4389.

Franz, C.M.P.A., M.E. Stiles, K.H. Schleifer y W.H. Holzapfel (2003). Enterococci in foods-a conundrum for food safety. Int. J. Food Microbiol., **88**: 105-122.

Franz, C.M.P.A., M.J. van Belkum, W.H. Holzapfel, H. Abriouel y A. Gálvez (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiol. Rev., **31**: 293-310.

Fregeau Gallagher, N.L., M. Sailer, W.P. Niemczura, T.T. Nakashima, M.E. Stiles y J.C. Vederas (1997). Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. Biochemistry, **36**: 15062-15072.

Freitas, D.A., S. Leclerc, A. Miyoshi, S.C. Oliveira, P.S.M. Sommer, L. Rodrigues, A. Correa, M. Gautier, P. Langella, V.A. Azevedo e Y. Le Loir (2005). Secretion of *Streptomyces tendae* antifungal protein 1 by *Lactococcus lactis*. Braz. J. Med. Biol. Res., **38**: 1585-1592.

Fremaux, C., Y. Héchard e Y. Cenatiempo (1995). Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. Microbiol., **141**: 1637-1645.

Fukata, T., Y. Hadate, E. Baba y A. Arakawa (1991). Influence of bacteria on *Clostridium perfringens* infections in young chickens. Avian Diseases, **35**: 224-227.

Gajic, O., G. Buist, M. Kojic, L. Topisirovic, O.P. Kuipers y J. Kok (2003). Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. J. Biol. Chem., **278**: 34291-34298.

Gálvez, A., E. Valdivia, H. Abriouel, E. Camafeita, E. Mendez, M. Martínez-Bueno y M. Maqueda (1998). Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. Arch. Microbiol., **171**: 59-65.

Gálvez, A., H. Abriouel, R.I. López y N.B. Omar (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int. J. Food Microbiol., **120**: 51-70.

Gambarotto, K., M.C. Ploy, F. Dupron, M. Giangiobbe y F. Denis (2001). Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in pork and poultry products from a cattle-rearing area of France. J. Clin. Microbiol., **39**: 2354-2355.

Gasson, M.J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. J. Bacteriol., **154**: 1-9.

Gellisen, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol., **54**: 741-750.

Gilmore, M.S., R.A. Segarra, M.C. Booth, C.P. Bogie, L.R. Hall y D.B. Clewell (1994). Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. J. Bacteriol., **176**: 7335-7344.

Giraffa, G., D. Carminati y E. Neviani (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. J. Food Prot., **60**: 732-738.

Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. Int. J. Food. Microbiol., **88**: 215-222.

Gosalbes, M.J., C.D. Esteban, J.L. Galán y G. Pérez-Martínez (2000). Integrative food-grade expression system based on the lactose regulon of *Lactobacillus casei*. Appl. Environ. Microbiol., **66**: 4822-4828.

- Granato, P.A. y R.W. Jackson (1969). Biocomponent nature of lysin from *Streptococcus zymogenes*. J. Bacteriol., 100: 856-868.
- Guinane, C.M., P.D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross (2005). Microbial solutions to microbial problems: lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. J. Appl. Microbiol., 98: 1316-1325.
- Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, M.F. Fernández, L.M. Cintas y P.E. Hernández (2004). Performance and applications of polyclonal anti-peptide antibodies with specificity for the enterococcal bacteriocin enterocin P. J. Agric. Food Chem., 52: 2247-2255
- Gutiérrez, J. (2005). Caracterización inmunoquímica de la enterocina P y evaluación de su clonación, producción y expresión funcional en *Escherichia coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Lactococcus lactis* y *Pichia pastoris*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, I.F. Nes, L.M. Cintas y P.E. Hernández (2005a). Cloning, production and functional expression of enterocin P, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13 in *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol., 103: 239-250
- Gutiérrez, J., D. Bourque, R. Criado, Y. Choi, L.M. Cintas, P.E. Hernández y C.B. Míguez (2005b). Heterologous extracellular production of enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in the methylophilic bacterium *Methylobacterium extorquens*. FEMS Microbiol. Lett., 248: 125-131.
- Gutiérrez, J., R. Criado, M. Martín, C. Herranz, L.M. Cintas y P.E. Hernández (2005c). Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 in *Pichia pastoris*. Antimicrob. Agents Chemother., 49: 3004-3008.
- Gutiérrez, J., R. Larsen, L.M. Cintas, J. Kok y P.E. Hernández (2006). High-level heterologous production and functional expression of the sec-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 17: 1-11.
- Haas, W., B.D. Shepard y M.S. Gilmore (2002). Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. Nature, 415: 84-87.
- Hancock, L.E. y M. Perego (2004). The *Enterococcus faecalis* fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. J. Bacteriol., 186: 5629-5639.
- Hancock, R.E.W. y H.G. Sahl (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat. Biotechnol., 24: 1551-1557.
- Harrington, S.M., T.L. Ross, K.A. Gebo y W.G. Merz (2004). Vancomycin resistance, esp, and strain relatedness: a 1-year study of enterococcal bacteremia. J. Clin. Microbiol., 42: 5895-5898.

Haugen, H.S., G. Fimland, J. Nissen-Meyer y P.E. Kristiansen (2005). Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A. Biochemistry, **44**: 16149-16157.

Håvarstein, L.S., B.D. Diep e I.F. Nes (1994). The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. Microbiol., **140**: 2383-2389.

Håvarstein, L.S., B.D. Diep e I.F. Nes (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. Mol. Microbiol., **16**: 229-240.

Hayes, J.R., L.L. English, P.J. Carter, T. Proescholdt, K.Y. Lee, D.D. Wagner y D.G. White (2003). Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. Appl. Environ. Microbiol., **69**: 7153-7160.

Hazebrouck, S., L. Pothelune, V. Azevedo, G. Corthier, J.M. Wal y P. Langella (2007). Efficient production and secretion of bovine β -lactoglobulin by *Lactobacillus casei*. Microbial Cell Factories, **6**: 12.

Henderson, J.T., A.L. Chopko y P.D. van Wassenaar (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. Arch. Biochem. Biophys., **295**: 5-12.

Herranz, C., S. Mukhopadhyay, P. Casaus, J.M. Martínez, J.M. Rodríguez, I.F. Nes, L.M. Cintas y P.E. Hernández (1999). Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. Curr. Microbiol., **39**: 282-290.

Herranz, C. (2000). Caracterización bioquímica y genética de enterocinas producidas por cepas de *Enterococcus faecium* de origen cárnico. Optimización de la producción y mecanismo molecular de acción de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Herranz, C. y A.J.M. Driessen (2005). Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., **71**: 1959-1963.

Hickey, R.M., D.P. Twomey, R.P. Ross y C. Hill (2003a). Potential of the enterocin regulatory system to control expression of heterologous genes in *Enterococcus*. J. Appl. Microbiol., **95**: 390-397.

Hickey, R.M., D.P. Twomey, R.P. Ross y C. Hill (2003b). Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. Microbiology, **149**: 655-664.

Higashide, T., M. Takahashi, A. Kobayashi, S. Ohkubo, M. Sakurai, Y. Shirao, T. Tamura y K. Sugiyama (2005). Endophthalmitis caused by *Enterococcus mundtii*. J. Clin. Microbiol., **43**: 1475-1476.

- Higgins, C.F. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview. Res. Microbiol., 152: 205-210.
- Holck, A., L. Axelsson, S.E. Birkeland, T. Aukrust y H. Blom (1992). Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* 706. J. Gen. Microbiol., 138: 2715-2720.
- Holo H. e I.F. Nes (1989). High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. Appl. Environ. Microbiol., 55: 3119-3123.
- Horn, N., M.I. Martínez, J.M. Martínez, P.E. Hernández, M.J. Gasson, J.M. Rodríguez y H.M. Dodd (1998). Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus. Appl. Environ. Microbiol., 64: 818-823.
- Horn, N., M.I. Martínez, J.M. Martínez, P.E. Hernández, M.J. Gasson, J.M. Rodríguez y H.M. Dodd (1999). Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 65: 4443-4450.
- Horn, N., A. Fernández, H.M. Dodd, M.J. Gasson y J.M. Rodríguez (2004). Nisin-controlled production of pediocin PA-1 and colicin V in nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains. Appl. Environ. Microbiol., 70: 5030-5032.
- Hsu, S. T., E. Breukink, E. Tischenko, M.A.G. Lutters, B. De Kruijff, R. Kaptein, A.M.J.J. Bonvin y N.A.J. van Nuland (2004). The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. Nature Struct. Mol. Biol., 11: 963-967.
- Hugas, M., M. Garriga y M.T. Aymerich (2003). Functionality of enterococci in meat products. Int. J. Food Microbiol., 88: 223-233.
- Huycke, M.M. y M.S. Gilmore (1995). Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. Plasmid, 34: 152-156.
- Huycke, M.M., D.F. Sahm y M.S. Gilmore (1998). Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerging Infectious Diseases, 4: 239-249.
- Ilgen, C., J. Lin-Cereghino y J.M. Cregg (2005). *Pichia pastoris*. In: G. Gellisen (Ed.), Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, pp. 143-162.
- Ingham, A.B., M. Ford, R.J. Moore y M. Tizard (2003). The bacteriocin piscicolin 126 retains antilisterial activity *in vivo*. J. Antimicrob. Chemother., 51: 1365-1371.
- Jack, R.W., J.R. Tagg y B. Ray (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiol. Rev., 59: 171-200.

Jacob A.E. y S.J. Hobbs (1974). Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. J. Bacteriol., 117: 360-372.

Jensen, L.B., A.M. Hammerum, R.L. Poulsen y H. Westh (1999). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains with highly similar pulsed-field gel electrophoresis patterns containing similar Tn1546-like elements isolated from a hospitalized patient and pigs in Denmark. Antimicrob. Agents Chemother., 43: 724-725.

Jett, B.D., H.G. Jensen, R.E. Nordquist y M.S. Gilmore (1992). Contribution of the pAD1-encoded cytotoxin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. Infect. Immun., 60: 2445-2452.

Jiménez-Díaz, R., J.L. Ruiz-Barba, D.P. Cathcart, H. Holo, I.F. Nes, K.H. Sletten y P.J. Warner (1995). Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. Appl. Environ. Microbiol., 61: 4459-4463.

Joerger, M.C. y T.R. Klaenhammer (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lb. helveticus* 481. J. Bacteriol., 167: 439-446.

Johansen, E. (2003). Challenges when transferring technology from *Lactococcus* laboratory strains to industrial strains. Genet. Mol. Res., 2: 112-116.

Johnsen, L., G. Fimland, D. Mantzilas y J. Nissen-Meyer. 2004. Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: the C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol., 70: 2647-2652.

Johnsen, L., G. Fimland y J. Nissen-Meyer (2005a). The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. J. Biol. Chem., 280: 9243-9250

Johnsen, L., B. Dalhus, I. Leiros y J. Nissen-Meyer (2005b). 1.56 Å crystal structure of entA-im: a bacterial immunity protein conferring immunity to the antimicrobial activity of the pediocin-like bacteriocin enterocin A. J. Biol. Chem., 280: 19045-19050.

Jung, G. (1991). Lantibiotics- ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α , β -didehydroamino acids. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 30: 1051-1192.

Kadokura, H., F. Hatzen y J. Beckwith (2003). Protein disulphide bond formation in prokaryotes. Annu. Rev. Biochem., 72: 111-135.

Kanatani, K., M. Oshimura y K. Sano (1995). Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 61: 1061-1067.

Kawamoto, S., S. Shima, R. Sato, T. Eguchi, S. Ohmomo, J. Shibato, N. Horikoshi, K. Takeshita y T. Sameshima (2002). Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFR17973. Appl. Environ. Microbiol., **68**: 3830-3840.

Kayser, F.H. (2003). Safety aspects of enterococci from the medicinal point of view. Int. J. Food Microbiol., **88**: 255-262.

Kemperman, R., A. Kuipers, H. Karsens, A. Nauta, O.P. Kuipers y J. Kok (2003a). Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularicin A and clostricin 574. Appl. Environ. Microbiol., **69**: 1589-1597.

Kemperman, R., M. Jonker, A. Nauta, O.P. Kuipers y J. Kok (2003b). Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularicin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. Appl. Environ. Microbiol., **69**: 5839-5848.

Klaenhammer, T.R. (1993). Genetic of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., **12**: 39-86.

Klare, I., H. Heier, H. Claus, G. Böhme, S. Marin, G. Selmann, R. Hakenbeck, V. Atanassova y W. Witte (1995). *Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from food-stuffs and fecal samples of humans in the community. Microbial Drug Resistance, **1**: 265-272.

Klare, I., C. Konstabel, D. Badstübner, G. Werner y W. Witte (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. Int. J. Food. Microbiol., **88**: 269-290.

Kleerebezem, M., R. Bongers, G. Rutten, W.M. de Vos y O.P. Kuipers (2004). Autoregulation of subtilin biosynthesis in *Bacillus subtilis*: the role of the *spa*-box in subtilin-responsive promoters. Peptides, **25**: 1415-1424.

Kok, J., M.B. Jos, M. van der Vossen y G. Venema. 1984. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., **48**: 726-731.

Konings, W.N., J. Kok, O.P. Kuipers y B. Poolman (2000). Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. Curr. Opin. Microbiol., **3**: 276-282.

Koort, J., T. Coenye, P. Vandamme, A. Sukura y J. Bjorkroth (2004). *Enterococcus hermanni* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **54**: 1823-1827.

Kouwen, T.R., A. van der Goot, R. Dorenbos, T. Winter, H. Antelmann, M.C. Plaisier, W.J. Quax, J. M. van Dijk y J.Y.F. Dubois. 2007. Thiol-disulphide oxidoreductase molecules in the low-GC Gram-positive bacteria. Mol. Microbiol., **64**: 984-999.

Kuipers, O.P., M.M. Beerthuyzen, P.G.G.A. De Ruyter, E.J. Luesink y M.W. de Vos (1995). Autorregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. J. Biol. Chem., 270: 299-304.

Kuipers, O.P., P.G.G.A. de Ruyter, M. Kleerebezem y W.M. de Vos (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. J. Biotechnol., 64: 15-21.

Kuipers, A., J. Wirenga, R. Rink, L.D. Kluskens, A.J.M. Driessen, O.P. Kuipers y G.N. Moll (2006). Sec-mediated transport of posttranslationally dehydrated peptides in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 72: 7626-7633.

Law-Brown, J. y P.R. Meyers (2003). *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53: 683-685.

Le Loir, Y., V. Azevedo, S. Oliveira, D.A. Freitas, A. Miyoshi, L.G. Bermúdez-Humarán, S. Nouaille, L.A. Ribeiro, S. Leclercq, J.E. Grabiell, V.D. Guimaraes, M.N. Oliveira, C. Charlier, M. Gautier y P. Langella (2005). Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. Microb. Cell Fact., 4: 2

Leavis, H., J. Top, N. Shankar, K. Borgen, M. Bouten, J. van Embden y R.J.L. Willems (2004). A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. J. Bacteriol., 186: 672-682.

Leclercq, R. (1997). Enterococci acquire new kinds of resistance. Clin. Infect. Dis., 24: 80-84.

Leenhouts, K., A. Bolhuis, G. Venema y J. Kok (1998). Construction of a food-grade multicopy integration system for *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 49: 417-423.

Leer, J.R., J.M.B.M. Van der Voosen, M. Van Gieze, J.M. Van Noor y P.H. Pouwels (1995). Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Microbiol., 141: 1629-1635.

Lepage, E., S. Brinster, C. Caron, C. Ducroix-Crepy, L. Rigottier-Gois, G. Dunny, C. Hennequet-Antier y P. Serror (2006). Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: identification of genes absent from food strains. J. Bacteriol., 188: 6858-6868.

Leroy, F. y L. De Vuyst (1999). The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. Appl. Environ. Microbiol., 65: 5350-5356.

Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 45: 999-1007.

Li, H. y D.J. O'Sullivan (2002). Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* bacteriocin nisin in a dairy *Enterococcus* strain. Appl. Environ. Microbiol., 68: 3392-3400.

Lindgren, S.E. y W.J. Dobrogosz (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Rev., 87: 149-164.

Lindholm, A., A. Smeds y A. Palva (2004). Receptor binding domain of *Escherichia coli* F18 fimbrial adhesin FedF can be both efficiently secreted and surface displayed in a functional form in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 70: 2061-2071.

Lu, H.Z., X.H. Weng, H. Li, Y.K. Yin, M.Y. Pang y T.W. Tang (2002). *Enterococcus faecium*-related outbreak with molecular evidence of transmission from pigs to human. J. Clin. Microbiol., 40: 913-917.

Lund, B. y C. Edlund (2001). Probiotic *Enterococcus faecium* strain is a possible recipient of the *vanA* gene cluster. Clin. Infect. Dis., 32: 1384-1385.

Macauley-Patrick, S., M.L. Fazenda, B. McNeil y L.M. Harvey (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast, 22: 249-270.

MacEachern, P., J.P. Giannoccaro, S. Elsayed, R.R. Read y K.B. Laupland (2005). A rare case of pleuropulmonary infection and septic shock associated with *Enterococcus faecium* endocarditis. J. Infect., 50: 84-88.

Maione D., I. Margarit, C.D. Rinaudo, V. Massignani, M. Mora, M. Scarselli, H. Tettelin, C. Brettoni, E.T. Iacobini, R. Rosini, N. D'Agostino, L. Miorin, S. Buccato, M. Mariani, G. Galli, R. Nogarotto, V. Nardi Dei, F. Vegni, C. Fraser, G. Mancuso, G. Teti, L.C. Madoff, L.C. Paoletti, R. Rappuoli, D.L. Kasper, J.L. Telford y G. Grandi (2005). Identification of a universal Group B *streptococcus* vaccine by multiple genome screen. Science, 309: 148-150.

Makinen, P., D.B. Clewell, F. An y K.K. Makinen (1989). Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10.). J. Biol. Chem., 264: 3325-3334.

Makinen, P. y K.K. Makinen (1994). The *Enterococcus faecalis* extracellular metalloendopeptidase (EC 3.4.24.30; coccolysin) inactivates human endothelin at bonds involving hydrophobic amino acid residues. Biochem. Biophys. Res. Commun., 200: 981-985.

Makrides, S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev., 60: 512-538.

Mao, Q., T. Schunk, K. Flukiger y B. Erni (1995). Functional reconstitution of the purified mannose phosphotransferase system of *Escherichia coli* into phospholipid vesicles. J. Biol. Chem., 270: 5258-5265.

Martín, B., M. Garriga, M. Hugas y M.T. Aymerich (2005). Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. J. Appl. Microbiol., 98: 1177-1190.

Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L.M. Cintas y P.E. Hernández (2006). Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). J. Food Prot., 69: 520-531.

Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L.M. Cintas y P.E. Hernández (2007a). Cloning, production and expresión of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 76: 667-675.

Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L.M. Cintas y P.E. Hernández (2007b). Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. J. Food Prot., 70: 2792-2798.

Martínez, J.M., M.I. Martínez, A. Suárez, C. Herranz, P. Casaus, L.M. Cintas, J.M. Rodríguez y P.E. Hernández (1998). Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. Appl. Environ. Microbiol., 64: 4536-4545.

Martínez, B., M. Fernández, J.E. Suárez y A. Rodríguez (1999). Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. Microbiol., 145: 3155-3161.

Martínez, J.M. (2000). Producción y empleo de anticuerpos de especificidad determinada para la detección, cuantificación y purificación de las bacteriocinas pediocina PA-1 y enterocina A y para el reconocimiento específico de su (co)expresión heteróloga en *Lactococcus lactis*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Martínez, J.M., J. Kok, J.W. Sanders y P.E. Hernández (2000a). Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. Appl. Environ. Microbiol., 66: 3543-3549.

Martínez, M.I., J.M. Martínez, C. Herranz, A.M. Suárez y J.M. Rodríguez (2000b). Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. Alimentaria, Julio-Agosto, pp. 59-66.

Martínez, S. (2003). Los enterococos en los alimentos: interés tecnológico y sanitario. Alimentación: equipos y tecnología.

Martínez-Bueno, M., M. Maqueda, A. Gálvez, B. Samyn, J. van Beeumen, J. Gollete y E. Valdivia (1994). Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. J. Bacteriol., 176: 6344-6339.

Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Ruiz-Rodríguez, J.J. Soler, M. Martín-Vivaldi, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). Appl. Environ. Microbiol., 72: 4245-4249.

Marugg, J.D., C.F. González, B.S. Kunka, A.M. Ledebøer, M.J. Pucci, M.Y. Toonen, S.A. Walker, L.C.M. Zoetmulder y P.A. Vandenberg (1992). Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. Appl. Environ. Microbiol., **58**: 2360-2367.

Mathiesen, G., E. Sorvig, J. Blatny, K. Naterstad, L. Axelsson y V.G.H. Eijsink (2004). High-level gene expression in *Lactobacillus plantarum* using a pheromone-regulated bacteriocin promoter. Lett. Appl. Microbiol., **39**: 137-143.

Mathur, S. y R. Singh (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. Int. J. Food Microbiol., **105**: 281-295.

McAuliffe, O., R.P. Ross y C. Hill (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS microbiol. Rev., **25**: 285-308.

McCormick, J.K., R.W. Worobo y M.E. Stiles (1996). Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. Appl. Environ. Microbiol., **62**: 4095-4099.

McCormick, J.K., T.R. Klaenhammer y M.E. Stiles (1999). Colicin V can be produced by lactic acid bacteria. Lett. Appl. Microbiol., **29**: 37-41.

McKessar, S.J., A.M. Berry, J.M. Bell, J.D. Turnidge y J.C. Paton (2000). Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother., **44**: 3224-3228.

Mendoza, F., M. Maqueda, A. Galvez, M. Martínez-Bueno y E. Valdivia (1999). Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48-adapted strain of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol., **65**: 618-625.

Michiels, J., G. Dirix, J. Vanderleyden y C. Xi (2001). Processing and export of peptide pheromones and bacteriocins in Gram-negative bacteria. Trends Microbiol., **9**: 164-168.

Mierau, I. y M. Kleerebezem (2005). 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **68**: 705-717.

Mierau, I., P. Leij, I. van Swam, B. Blommestein, E. Floris, J. Mond y E.J. Smid (2005). Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE: The case of lysostaphin. Microbial Cell Factories, **4**: 15.

Miller, K.W., R. Schamber, O. Osmanagaoglu y B. Ray (1998). Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. Appl. Environ. Microbiol., **64**: 1997-2005.

Miller, M. B. y B. L. Bassler (2001). Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol., **55**: 165-199.

Miller, K.W., P. Ray, T. Steinmetz, T. Hanekamp y B. Ray (2005). Gene organization and sequences of pediocin ACH/PA-1 production operons in *Pediococcus* and *Lactobacillus* plasmids. Lett. Appl. Microbiol., 40: 50-62.

Miyoshi, A., I. Poquet, V. Azevedo, J. Commissaire, L. Bermudez, E. Domakova, Y. Le Loir, S.C. Oliveira, A. Gruss y P. Langella (2002). Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 68: 3141-3146.

Moll, G.N., W.N. Konings y A.J.M. Driessen (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. Antonie van Leeuwenhoek, 76: 185-198.

Monedero, V., J. Rodríguez, R. Viana, J. Buesa y G. Pérez-Martínez (2004). Selection of single-chain antibodies against the VP8* subunit of Rotavirus VP4 outer capsid protein and their expression in *Lactobacillus casei*. Appl. Environ. Microbiol., 70: 6936-6939.

Moon, G.S., Y.R. Pyun, M.S. Park, G.E. Ji y W.J. Kim (2005). Secretion of recombinant pediocin PA-1 by *Bifidobacterium longum*, using the signal sequence for bifidobacterial α -amylase. Appl. Environ. Microbiol., 71: 5630-5632.

Mora, M., G. Bensi, S. Capo, F. Falugi, C. Zingaretti, A.G.O. Manetti, T. Maggi, A.R. Taddei, G. Grandi y J.L. Telford (2005). Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. PNAS, 102: 15641-15646.

Moreno, M.R., J.J. Leistner, L.K. Tee, C. Ley, G. Rusul, M. Vancanneyt y L. De Vuyst (2002). Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. J. Appl. Microbiol., 92: 147-157.

Morriset, D. y J. Frère (2002). Heterologous expression of bacteriocins using the mesentericin Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc mesenteroides*. Biochimie, 84: 569-576.
Morrison, D., N. Woodford y B. Cookson (1997). Enterococci as emerging pathogens in humans. J. Appl. Microbiol., (Suppl. 83): 89S-99S.

Motlagh A.M., A.K. Bhunia, F. Szostek, T.R. Hansen, M.C. Johnson y B. Ray (1992). Nucleotide and amino acid sequence of *pap*-gene (pediocin ACH production) in *Pediococcus acidilactici* H. Lett. Appl. Microbiol., 15: 45-48.

Mundy, L.M., D.F. Sahm y M.S. Gilmore (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev., 13: 513-522.

Murphy, J., M.L. Devane, B. Robson y B.J. Gilpin (2005). Genotypic characterization of bacteria cultured from duck faeces. J. Appl. Microbiol., 99: 301-309.

Murray, B.E. (1990). The life and times of the Enterococcus. Clin. Microbiol. Rev., 3: 46-65.

Mylonakis, E., M. Engelbert, X. Qin, C.D. Sifri, B.E. Murray, F.M. Ausubel, M.S. Gilmore y S.B. Calderwood (2002). The *Enterococcus faecalis* *fsrB* gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model. Infect. Immun., **70**: 4678-4681.

Nallapareddy, S.R., K.V. Singh, R.W. Duh, G.M. Weinstock y B.E. Murray (2000a). Diversity of *ace*, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of ACE during human infections. Infect. Immun., **68**: 5210-5217.

Nallapareddy, S.R., X. Qin, G.M. Weinstock, M. Höök y B.E. Murray (2000b). *Enterococcus faecalis* adhesin, *ace*, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. Infect. Immun., **68**: 5218-5224.

Nallapareddy, N., H. Wenxiang, G.M. Weinstock y B. Murray (2005). Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. J. Bacteriol., **187**: 5709-5718.

Nallapareddy, S.R., K.V. Singh, J. Sillanpää, D.A. Garsin, M. Höök, S.L. Erlandsen y B.E. Murray (2006). Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. J. Clin. Invest., **116**: 2799-2807.

Naser, S.M., M. Vancanneyt, E. De Graef, L.A. Devriese, C. Snauwaert, K. Lefebvre, B. Hoste, P. Svec, A. Decostere, F. Haesebrouck, J. Swings (2005). *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **55**: 2177-2182.

Natale, P., T. Brüser y A.J.M. Driessen (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—Distinct translocases and mechanisms. Biochimica et Biophysica Acta, **1778**: 1735–1756.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth Informational Supplement, vol. 21. NCCLS, Villanova, Pa.

Nes, I.F., D.B. Diep, L.S. Håvarstein, M.B. Brurberg, V.G. Eijsink y H. Holo (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, **70**: 113-128.

Nes I.F. y V.G.H. Eijsink (1999). Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanism. En "Cell-Cell Signaling in Bacteria". Dunny G.M. y S.C. Winans (eds). American Society for Microbiology, Washington, DC., (EEUU).

Nes, I.F. y H. Holo (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. Biopolymers, **55**: 50-61.

Nes, I.F., D.B. Diep y H. Holo (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. J. Bacteriol., **189**: 1189-1198.

- Nieto-Lozano, J.C., J. Nissen-Meyer, K. Sletten, C. Peláez e I.F. Nes (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Gen. Microbiol., 138: 1985-1990.
- Nijland, R., R. Heerlien, L.W. Hamoen y O.P. Kuipers (2007). Changing a single amino acid in *Clostridium perfringens* β -toxin affects the efficiency of heterologous secretion in *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol., 73: 1586-1593.
- Nilsen, T., I.F. Nes y H. Holo (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Appl. Environ. Microbiol., 69: 2975-2984.
- Nissen-Meyer, J. e I.F. Nes (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. Arc. Microbiol., 167: 67-77.
- Nouaille, S., L.A. Ribeiro, A. Miyoshi, D. Pontes, Y. Le Loir, S.C. Oliveira, P. Langella y V. Azevedo (2003). Heterologous production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. Genet. Mol. Res., 2: 102-111.
- O'Keeffe, T., C. Hill y R.P. Ross (1999). Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC 1146. Appl. Environ. Microbiol., 65: 1506-1515.
- O'Sullivan, L., R.P. Ross y C. Hill (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie, 84: 593-604.
- O'Toole, G., H.B. Kaplan y R. Kolter (2000). Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol., 54: 49-79.
- Owings, W.J., D.L. Reynolds, R.J. Hasiak y P.R. Ferket (1990). Influence of dietary supplementation with *Streptococcus faecium* M-74 on broiler body weight, feed conversion, carcass characteristics, and intestinal microbial colonization. Poultry Science, 69: 1257-1264.
- Pappas, G., E. Liberopoulos, E. Tsianos y M. Elisaf (2004). *Enterococcus casseliflavus* bacteremia. Case report and literature review. J. Infect., 48: 206-208.
- Parsek, M.R. y P.K. Singh (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu. Rev. Microbiol., 57: 677-701.
- Paulsen, I., L. Banerjee, G.S.A. Myers, K.E. Nelson, R. Seshadri, T.D. Read, D.E. Fouts, J.A. Eisen, S.R. Gill, J.F. Heidelberg, H. Tettelin, R.J. Dodson, L. Umayam, L. Brinkac, M. Beanan, S. Daugherty, R.T. DeBoy, S. Durkin, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, J. Vamathevan, B. Tran, J. Upton, T. Hansen, J. Shetty, H. Khouri, T. Utterback, D. Radune, K.A. Ketchum, B.A. Dougherty y C.M. Fraser (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Science, 299: 2071-2074.

Pillar, C.M. y M.S. Gilmore (2004). Enterococcal virulence-pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. Front. Biosci., 9: 2335-2346.

Poyart, C., T. Lambert, P. Morand, P. Abassade, G. Quesne, Y. Baudouy y P. Trieu-Cuot (2002). Native valve endocarditis due to *Enterococcus hirae*. J. Clin. Microbiol., 40: 2689-2690.

Pöhlschroder, M., W.A. Prinz, E. Hartmann y J. Beckwith (1997). Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. Cell, 91: 563-566.

Postma, P.W., J.W. Lengeler y G.R. Jacobson (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. Microbiol. Rev., 57: 543-594.

Pugsley, A.P. (1993). The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. Microbiol. Rev., 57: 50-108.

Qin, X., K.V. Singh, G.M. Weinstock y B.E. Murray (2000). Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. Infect. Immun., 68: 2579-2586.

Qin, X., K.V. Singh, G.M. Weinstock y B.E. Murray (2001). Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. J. Bacteriol., 183: 3372-3382.

Quadri, L.E., L.Z. Yan, M.E. Stiles y J.C. Vederas (1997). Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2. Overproduction of the antimicrobial peptide, its engineered variants, and its precursor in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 272: 3384-3388.

Rantsiou, K., R. Urso, L. Iacumin, C. Cantoni, P. Cattaneo, G. Comi y L. Cocolin (2005). Culture-dependent and culture-independent methods to investigate the microbial ecology of italian fermented sausages. Appl. Environ. Microbiol., 71: 1977-1986.

Rich, R.L., B. Kreikemeyer, R.T. Owens, S. LaBrenz, S.V.L. Narayana, G.M. Weinstock, B.E. Murray y M. Höök (1999). Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. J. Biol. Chem., 274: 26939-26945.

Richard, C., D. Drieder, I. Fliss, S. Denery y H. Prevost (2003). Generation and utilization of polyclonal antibodies to a synthetic C-terminal amino acid fragment of divercin V41, a class IIa bacteriocin. Appl. Environ. Microbiol., 70: 248-254.

Riley, M.A. y J.E. Wertz (2002). Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. Annu. Rev. Microbiol., 56: 117-137.

Risøen, P.A., M.B. Brurberg, V.G.H. Eijsink e I.F. Nes (2000). Functional analysis of promoters involved in quorum sensing-based regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus*. Mol. Microbiol., 37: 619-628.

Rose, N.L., P. Sporns y L.M. McMullen (2001). Production of antibodies against enterocin B for immunological detection and purification purposes. Food Agric. Immunol., **13**: 225-239.

Ross, R.P., M. Galván, O. McAuliffe, S.M. Morgan, M.P. Ryan, D.P. Twomey, W.J. Meaney y C. Hill (1999). Developing applications for lactococcal bacteriocins. Antonie van Leeuwenhoek, **76**: 337-346.

Ruiz-Barba, J.L., B. Floriano, A. Maldonado-Barragán y R. Jiménez-Díaz (2006). Molecular analysis of the 21-kb bacteriocin-encoding plasmid pEF1 from *Enterococcus faecium* 6T1a. Plasmid, **57**: 175-181.

Ruoff, K.L. (1990). Recent taxonomic changes in the genus *Enterococcus*. Curr. Topic Rev., **9**: 75-79.

Ryan, M.P., O. McAuliffe, R.P. Ross y C. Hill (1999). Heterologous expression of lactacin 3147 in *Enterococcus faecalis*: comparison of biological activity with cytolysin. Lett. Appl. Microbiol., **32**: 71-77.

Saavedra, L., M.P. Taranto, F. Sesma y G.F. de Valdez (2003). Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. Int. J. Food Microbiol., **88**: 241-245. Erratum in Int J Food Microbiol., **97**: 231

Sablon, E., B. Contreras y E. Vandamme (2000). Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. Adv. Biochem. Engin. Biotechnol., **68**.

Sánchez, J., A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L.M. Cintas y P.E. Hernández (2007a). Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). Int. J. Food Microbiol., **117**: 295-305.

Sánchez, J., D.B. Diep, C. Herranz, I.F. Nes, L.M. Cintas y P.E. Hernández (2007b). Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). FEMS Microbiol. Lett., **270**: 227-236.

Sánchez, J., J. Borrero, B. Gómez-Sala, A. Basanta, C. Herranz, L.M. Cintas y P.E. Hernández (2008). Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. Appl. Environ. Microbiol., **74**: 2471-2479.

Sánchez-Hidalgo, M., M. Maqueda, A. Gálvez, H. Abriouel, E. Valdivia y M. Martínez-Bueno (2003). The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. Appl. Environ. Microbiol., **69**: 1633-1641.

Sarantinopoulos, P., C. Andrighetto, M.D. Georgalaki, M.C. Rea, A. Lombarda, T.M. Cogan, G. Kalantzopoulos y E. Tsakalidou (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. Int. Dairy J., **11**: 621-647.

- Sartingen, S., E. Rozdzinski, A. Muscholl-Silberhorn y R. Marre (2000). Aggregation substance increases adherence and internalization, but no translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. Infect. Immun., **68**: 6044-6047.
- Schillinger U. y F.K. Lucke (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol., **55**: 1901-1906.
- Schleifer, K.H. y R. Kilpper-Bälz (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* and comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., **34**: 31-34.
- Schoeman, H., M.A. Vivier, M. du Toit, L. M. T. Dicks e I. S. Pretorius (1999). The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, **15**: 647-656.
- Schouten, M., J. Hoogkamp-Korstanje, J. Meis y A. Voss (2000). Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **19**: 812- 822.
- Schuster, M., A. Einhauer, E. Wasserbauer, F. Subenbacher, C. Ortner, M. Paumann, G. Werner y A. Jungbauer (2000). Protein expression in yeast; comparison of two expression strategies regarding protein maturation. J. Biotechnol., **84**: 237-248.
- Semedo, T., M.A. Santos, M.F.S. Lopes, J.J.F. Marqués, M.T.B. Crespo y R. Tenreiro (2003a). Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus?. Syst. Appl. Microbiol., **26**: 13-22.
- Semedo, T., M.A. Santos, P. Martins, M.F.S. Lopes, J.J.F. Marqués, R. Tenreiro y M.T.B. Crespo (2003b). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine haemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. J. Clin. Microbiol., **41**: 2569-2576.
- Sgorbati, B., B. Bivati y D. Palenzona (1995). The genus *Bifidobacterium*. In The Genera of Lactic Acid Bacteria, pp. 279-376. Edited by B. J. B. Wood & W. H. Holzapfel. London: Blackie Academic & Professional.
- Shankar, V., A.S. Baghdayan, M.M. Huycke, G. Lindahl y M.S. Gilmore (1999). Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. Infect. Immun., **67**: 193-200.
- Shankar, N., A.S. Baghdayan y M.S. Gilmore (2002). Modification of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Nature, **417**: 746-750.
- Shankar, N., P. Coburn, C. Pillar, W. Haas y M.S. Gilmore (2004). Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. Int. J. Med. Microbiol., **293**: 609-618.

Sherwood, N.P., B.E. Russell, A.R. Jay y K. Bowman (1949). Studies on streptococci: III. New antibiotic substances produced by beta haemolytic streptococci. J. Infect. Dis., 84: 88-91.

Sianidis, G., S. Karamanou, E. Vrontou, K. Boulias, K. Repanas, N. Kyripides, A.S. Politou y A. Economou (2001). Cross-talk between catalytic and regulatory elements in a DEAD motor domain is essential for SecA function. EMBO J., 20: 961-970.

Sifri, C.D., E. Mylonakis, K.V. Singh, X. Qin, D.A. Garsin, B.E. Murray, F.M. Ausubel y S.B. Calderwood (2002). Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. Infect. Immun., 70: 5647-5650.

Simpson, W. J. y H. Taguchi (1995). The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In The Lactic Acid Bacteria, vol. 2, The Genera of Lactic Acid Bacteria, pp. 125-172. Edited by B. J. B. Wood & W. H. Holzapfel. London: Blackie Academic & Professional.

Singh, K.V., T.M. Coque, G.M. Weinstock y B.E. Murria (1998). In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 21: 323-331.

Siragusa, G.R. (1992). Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus hirae*. Appl. Environ. Microbiol., 58: 3508-3513.

Skaugen, M., V.H. Christie e I.F. Nes (1999). Biosynthesis of the lantibiotic lactocin S : heterologous expression of a two-operon gene cluster encoding regulatory, biosynthetic, and immunity functions. Abstracts of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, FEMS, Veldhoven, Holanda, C86.

Skaugen, M., L.M. Cintas e I.F. Nes (2003). Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. En "Genetics of Lactic Acid Bacteria", vol. 3, pp. 225-260. Wood, B.J.B. y P. Warner (eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers. (EE.UU.).

Smith M.C.A. y C.D. Thomas (2004). An accessory protein is required for relaxosome formation by small staphylococcal plasmids. J. Bacteriol., 186: 3363-3373.

Sorvig, E., G. Mathiesen, K. Naterstad, V.G.H. Eijsink y L. Axelsson (2005). High level, inducible gene expression in *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. Microbiology, 151: 2439-2449.

Sprules, T., K.E. Kawulka, A.C. Gibbs, D.S. Wishart y J.C. Vederas (2004). NMR solution structure of the precursor for carnobacteriocin B2, an antimicrobial peptide from *Carnobacterium piscicola*. Eur. J. Biochem., 271: 1748-1756.

Stepanovic, S., M. Jovanovic, L. Lavadinovic, B. Stosovic y M. Pelemis (2004). *Enterococcus durans* endocarditis in a patient with transposition of the great vessels. J. Med. Microbiol., 53: 259-261.

- Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 70: 331-345.
- Suárez, A.M., J.M. Rodríguez, P.E. Hernández y J.I. Azcona (1996). Generation of polyclonal antibodies against nisin: immunization strategies and immunoassay development. Appl. Environ. Microbiol., 62: 2117-2121.
- Suárez, A.M., J.I. Azcona, J.M. Rodríguez, B. Sanz y P.E. Hernández (1997). One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography. Appl. Environ. Microbiol., 63: 4990-4992.
- Süßmuth, S.D., A. Muscholl-Silberhorn, R. Wirth, M. Susa, R. Marre y E. Rozdzinski (2002). Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. Infect. Immun., 68: 4900-4906.
- Suzzi, G., A. Lombardi, M.T. Lanorte, M. Caruso, C. Andrighetto y F. Gardini (2000). Characterization of autochthonous enterococci isolated from Semicotto Caprino Cheese, a traditional cheese produced in Southern Italy. J. Appl. Microbiol., 89: 267-274.
- Svec, P., M. Vancanneyt, L.A. Devriese, S.M. Naser, C. Snauwaert, K. Lefebvre, B. Hoste y J. Swings (2005a). *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55: 2183-2187.
- Svec, P., M. Vancanneyt, J. Koort, S.M. Naser, B. Hoste, E. Vihavainen, P. Vandamme, J. Swings y J. Bjorkroth (2005b). *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55: 2479-2484.
- Svec, P., M. Vancanneyt, I. Sedlacek, S.M. Naser, C. Snauwaert, K. Lefebvre, B. Hoste y J. Swings (2006). *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56: 577-581.
- Swe, P.M., N.C.K. Heng, Y-T. Ting, H.J. Baird, A. Carne, A. Tauch, J.R. Tagg y R.W. Jack (2007). *ef1097* and *ypkK* encode enterococcin V583 and corynicin JK, members of a new family of antimicrobial proteins (bacteriocins) with modular structure from Gram-positive bacteria. Microbiology, 153: 3218-3227.
- Sybesma, W., M. Starrenburg, M. Kleerebezem, I. Mierau, W.M. de Vos, y J. Hugenholtz (2003). Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 69: 3069-3076
- Takala, T.M. y P. E. Saris. 2002. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene *nisl*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 59: 467-471.

Takala, T.M., P.E.J. Saris y S.S.H. Tynkynen (2003). Food-grade host/vector expression system for *Lactobacillus casei* based on complementation of plasmid-associated phospho- β -galactosidase gene *lacG*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 60: 564-570.

Teixeira, L.M., M.G. Carvalho, M.M. Espinola, A.G. Steigerwalt, M.P. Douglas, D.J. Brenner y R.R. Facklam (2001). *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 1737-1743.

Tendolkar, P.M., A.S. Baghdayan, M.S. Gilmore y N. Shankar (2004). Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect. Immun., 72: 6032-6039.

Teuber, M. (1995). The genus *Lactococcus*. In The Genera of Lactic Acid Bacteria, pp. 173-234. Edited by B. J. B. Wood & W. H. Holzapfel. London: Blackie Academic & Professional.

Theppangna, W., T. Murase, N. Tokumaru, H. Chikumi y K. Otsuki (2007). Screening of enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins. J. Vet. Med. Sci., 69: 1235-1239.

Tichaczek P.S., J. Nissen-Meyer, I.F. Nes, R.F. Vogel y W.P. Hammes (1992). Characterization of the bacteriocins curvacin A and sakacin P produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and *Lactobacillus sake* LTH673. Syst. Appl. Microbiol., 15: 460-468.

Toledo-Arana, A., J. Valle, C. Solano, M.J. Arrizubieta, C. Cucarella, M. Lamata, B. Amorena, J. Leiva, J.R. Penadés e I. Lasa (2001). The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol., 67: 4538-4545.

Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto e Y. Ike (1996). Cloning and characterization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-response conjugative plasmid pY117. J. Bacteriol., 178: 3585-3593.

Trotter, M., R.P. Ross, G.F. Fitzgerald y A. Coffey (2002). *Lactococcus lactis* DPC5598, a plasmid-free derivative of a commercial starter, provides a valuable alternative host for culture improvement studies. J. Appl. Microbiol., 93: 134-143.

Tyrrell, G.J., L. Turnbull, L.M. Teixeira, J. Lefebvre, Mda.G. Carvalho, R.R. Facklam y M. Lovgren (2002). *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. J. Clin. Microbiol., 40: 1140-1145.

Uteng, M., H.H. Hauge, P.R. Markwick, G. Fimland, D. Mantzilas, J. Nissen-Meyer y C. Muhle-Goll (2003). Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. Biochemistry, 42: 11417-11426.

Van Belkum, M.J. y M.E. Stiles (1995). Molecular characterization of genes involved in the production of leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. Appl. Environ. Microbiol., 61: 3573-3579.

- Van Belkum, M.J., R.W. Worobo y M.E. Stiles (1997). Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol., **23**: 1293-1301.
- Van de Guchte, M., J.M.B.M. van der Vossen, J. Kok y G. Venema (1989). Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl. Environ. Microbiol., **55**: 224-228.
- Van der Sluis, E.O. y A.J.M. Driessen (2006). Stepwise evolution of the Sec machinery in Proteobacteria. TRENDS in Microbiology, **14**: 105-108.
- Van der Vossen, J.M.B.M., D. Van der Lelie, G. Venema y J. Kok (1987). Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. Appl. Environ. Microbiol., **53**: 2452-2457.
- Van der Vossen, J.M.B.M., M.H.M. Van Herwijnen, R. Leer, B. ten Brink, P.H. Pouwels y J.H.J. Huist in't Veld (1994). Production of acidocin B, a bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* M46 is a plasmid encoded trait: plasmid curing, genetic marking by *in vivo* plasmid integration and gene transfer. FEMS Microbiol. Lett., **116**: 333-340.
- Van Reenen, C.A., M. L. Chikindas, W. H. van Zyl y L.M.T. Dicks. 2002. Characterization and heterologous expression of a class IIA bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Food Microbiol., **81**: 29-40.
- Van Wely, K.H.M., J. Swaving, R. Freudl y A.J.M. Driessen (2001). Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Rev., **25**: 437-454.
- Vancanneyt, M., A. Lombardi, C. Andrighetto, E. Knijff, S. Torriani, K.J. Bjorkroth, C.M. Franz, M.R. Foulquie-Moreno, H. Revets, L. de Vuyst, J. Swings, K. Kersters, F. Dellaglio y W.H. Holzapfel (2002). Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. Appl. Environ. Microbiol., **68**: 1381-1390.
- Vancanneyt, M., M. Zamfir, L.A. Devriese, K. Lefebvre, K. Engelbeen, K. Vandemeulebroecke, M. Amar, L. De Vuyst, F. Haesebrouck y J. Swings (2004). *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **54**: 2175-2179.
- Vendrell, D., J.L. Balcázar, I. Ruiz-Zarzuela, I. de Blas, O. Gironés y J.L. Múzquiz (2007). Safety and efficacy of an inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Prev. Vet. Med., **80**: 222-229.
- Venema, K., R.E. Haverkort, T. Abee, A.J. Haandrikman, K.J. Leenhouts, L. de Leij, G. Venema y J. Kok (1994). Mode of action of LciA, the lactococcal A immunity protein. Mol. Microbiol., **14**: 521-532.

- Venema, K., J. Kok, J.D. Marugg, M.Y. Toonen, A.M. Ledeboer, G. Venema y M.L. Chikindas (1995). Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. Mol. Microbiol., 17: 515-522.
- Vergis, E.N., N. Shankar, J.W. Chow, M.K. Hayden, D.R. Snyderman, M.J. Zervos, P.K. Linden, M.M. Wagener y R.R. Muder (2002). Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. Clin. Infect. Dis., 35: 570-575.
- Villani, F., M. Aponte, G. Baioatta, G. Muriello, O. Pepe y G. Moschetti (2001). Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garviae* isolated from raw cow's milk. J. Appl. Microbiol., 90: 430-439.
- Von Heijne G. (1983). Patterns of amino acids near signal sequence cleavage sites. Eur. J. Biochem., 133: 17-21.
- Wachsman, M.B., V. Castilla, A.P. de Ruiz Holgado, R.A. de Torres, F. Sesma y C.E. Coto (2003). Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication *in vitro*. Antivir. Res., 58: 17-24.
- Wandersman, C. (1992). Secretion across the bacterial outer membrane. Trends Genet., 8: 317-322.
- Wandersman, C. (1998). Protein and peptide secretion by ABC exporters. Res. Microbiol., 149: 163-170.
- Wang, Y., M.E. Henz, N.L. Fregeau Gallagher, S. Chai, A.C. Gibbs, L.Z. Yan, M.E. Stiles, D.S. Wishart y J.C. Vederas (1999). Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. Biochem., 38: 15438-15447.
- Ward, B. (1999). Meeting preview: delivering the goods. Microbiol. Today., 26: 74-76.
- Waters, C.M., M.H. Antiporta, B.E. Murray y G.M. Dunny (2003). Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. J. Bacteriol., 185: 3613-3623.
- Whitchurch, C.B., T. Tolker-Nielsen, P.C. Ragas y J.S. Mattick (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science, 295: 1487.
- Wiedemann, I., E. Breukink, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, G. Bierbaum, B. de Kruijff y H. Sahl (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. J. Biol. Chem., 276: 1772-1779.

Wiedemann, I., R. Benz y H.G. Sahl (2004). Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study. J. Bacteriol., 186: 3259-3261.

Willems, R.J., W. Homan, J. Top, M. van Santen-Verheue, D. Tribe, X. Manziros, C. Gaillard, C.M. Vandenbroucke-Grauls, E.M. Mascini, E. van Kregten, J.D. van Embden y M.J. Bouten (2001). Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. Lancet, 357: 853-855.

Worobo, R.W., M.J. Van Belkum, M. Sailer, K.L. Roy, J.C. Vederas y M.E. Stiles (1995). A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. J. Bacteriol., 177: 3143-3149.

Wu, J., S. Hu y L. Cao (2007). Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. Antimicrob. Agents Chemother., 51: 3131-3135.

Wunderlich, P.F., L. Braun, I. Fugamalli, V. D'apuzzo, F. Heim, M. Karly, R. Lodi, G. Politta, F. Vonbank y L. Ja Zeltner (1989). Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. J. Int. Med. Res., 17: 333-338.

Yamamoto, Y., Y. Togawa, M. Shimosaka y M. Okazaki (2003). Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. Appl. Environ. Microbiol., 69: 5746-5753.

Yousif, N.M.K., P. Dawyndt, H. Abriouel, A. Wilaya, U. Schillinger, M. Vancaynnet, J. Swings, H.A. Dirar, W.H. Holzapfel y C.M.A.P. Franz (2005). Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from "Hussuva", an African fermented sorghum product. J. Appl. Microbiol., 98: 216-228.

Bibliografía consultada para la elaboración del apartado II.5. **El ánade real (*Anas platyrhynchos*)**:

- Aves nidificantes de España. Ediciones Jaguar, S.A. ISBN 84-95537-80-X.
- Aves del mundo. Equipo de Edición S.L., Barcelona. ISBN 978-1-40547-827-4.
- <http://www.usuarios.com/ib305742/a/a1/mas/anadeazulon.htm>

ABREVIATURAS

A: Adenina
A₂₅₄: Absorbancia a 254 nm
ABC: del inglés *ATP Binding Cassette*
ABTS: 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid
Ace: del inglés *Adhesin of Collagen from Enterococcus faecalis*
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
ADP: del inglés *Adenosin Diphosphate*
ADT: del inglés *Agar Diffusion Test*
AG: aparato de Golgi
Agg: sustancia de agregación
ARN: Ácido Ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ARNr: ARN ribosómico
AS: del inglés *Aggregation Substance*
ATP: del inglés *Adenosine Triphosphate*
BAL: Bacterias Ácido-lácticas
BAP: Bacterias productoras de Ácido propiónico
BHI: del inglés *Brain Heart Infusion* (medio de cultivo)
BMM: Medio de cultivo mínimo para *Pichia pastoris*
BMMY: Medio de cultivo complejo para *Pichia pastoris*
bp: del inglés *basis pair*
BU: del inglés *Bacteriocin Unit*
C: Citosina
Cm: del inglés *Chloramphenicol*
Cyl: del inglés *Cytolysin*
Da: Dalton
Dha: Deshidroalanina
Dhb: Deshidrobutirina
DSB: del inglés *Disulfide Bond*
DTS: del inglés *Dedicated Transport System*
Ebp: del inglés *Encoding endocarditis and Biofilm-associated Pili*
EBS: del inglés *Enterococcal Binding Substance*
EDTA: Etilén Diamino Tetracetato Disódico
ELISA: Ensayo inmunoenzimático ELISA (del inglés *Enzyme Linked-ImmunoSorbent Assay*)
ELISA-NCI: Ensayo ELISA No Competitivo Indirecto
EntJS: enterocina JS
EntL50: enterocina L50
EntP: enterocina P
EntQ: enterocina Q
Esp: del inglés *Enterococcal Surface Protein*
Esp_{fm}: Esp de *Enterococcus faecium*
FPLC: del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*
Fsr: del inglés *E. faecalis Regulator*
G: Guanina
GelE: del inglés *Gelatinase*
GM17: Medio M17 con glucosa
GRAS: del inglés *Generally Recognized as Safe*
GSP: del inglés *General Secretory Pathway*

GTP: del inglés *Guanosine Triphosphate*
HirJM79: hiracina JM79
HPK: del inglés *Histidine Protein Kinase*
IF: del inglés *Induction Factor*
KAA: del inglés *Kanamycin Aesculin Azide agar* (medio de cultivo)
kb: Kilobases
kDa: Kilodalton
KLH: del inglés *keyhole limpet hemocyanin*
LAB: del inglés *Lactic Acid Bacteria*
Lan: Lantionina
LB: Luria-Bertani (medio de cultivo)
MALDI-TOF: del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight*
Man-PTS: del inglés *Mannose Phosphotransferase System*
MDR: del inglés *Multidrug Resistance Transporters*
MeLan: β Metil-lantionina
MPA: del inglés *Microtiter Plate Assay*
MRS: de Man, Rogosa y Sharpe (medio de cultivo)
MSCRAMMs: del inglés *Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules*
NBD: del inglés *Nucleotide-Binding Domain*
NBS: del inglés *Nucleotide-Binding Site*
NCI-ELISA: del inglés *Non-Competitive Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
NICE: del inglés *Nisin Controlled Expression System*
NisA: nisina A
ORF: del inglés *Open Reading Frame*
PA: Proteína Accesorio
PAI: del inglés *Pathogenicity Island*
Pb: Pares de bases
PCR: del inglés *Polymerase Chain Reaction*
PedA-1: pediocina PA-1
PME: Proteína de la Membrana Externa
PMF: del inglés *Proton Motive Force*
PrtP: Proteinasa asociada a la pared celular
QPS: del inglés *Qualified Presumption of Safety*
RBS: del inglés *Ribosome Binding Site*
RE: Retículo endoplasmático
RR: del inglés *Regulator Response*
SakA: sakacina A
SDS-PAGE: del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SP: del inglés *Signal Peptide*
SP_{EntP}: Péptido Señal de la enterocina P
SP_{HirJM79}: Péptido Señal de la hiracina JM79
SprE: del inglés *Serine-protease de Enterococcus*
SRP: del inglés *Signal Recognition Particle*
T: Timina
TIA: Toxiinfección Alimentaria
TMD: del inglés *Transmembrane Domain*

TMS: del inglés *Transmembrane Segment*

TSB: Tryptone Soya Broth (medio de cultivo)

Usp45: del inglés *Unknown Secreted Protein of 45 kDa*

VRE: del inglés *Vancomycin Resistant Enterococci*

w/v: del inglés *weight/volume*

YPD: Yeast extract/Peptone/Dextrose (medio de cultivo)

Zeo: del inglés *Zeocin*

LISTADO DE TABLAS

Capítulo II

Tabla II.1.	Esquema de la clasificación propuesta para las bacteriocinas	31
Tabla II.2.	Secuencia aminoacídica de algunas bacteriocinas sintetizadas sin péptido señal o secuencia líder	42
Tabla II.3.	Factores de virulencia identificados en microorganismos del género <i>Enterococcus</i>	46
Tabla II.4.	Secuencia aminoacídica de las extensiones N-terminales del tipo “secuencia líder” de algunas bacteriocinas.....	58
Tabla II.5.	Secuencia aminoacídica de los péptidos señal de algunas bacteriocinas secretadas mediante la ruta general de secreción (GSP) o sistema Sec-dependiente.....	61
Tabla II.6.	Producción heteróloga de bacteriocinas en bacterias lácticas basada en la expresión de genes nativos.....	70

Capítulo III/Chapter III

Table III.1.	Antimicrobial activity of representative isolates and classification into different inhibitory groups	93
Table III.2.	PCR-amplification of bacteriocin structural genes from isolates of the intestinal content and carcasses of mallard ducks (<i>Anas platyrhynchos</i>)	94
Table III.3.	Production of bacteriocins and antimicrobial activity of <i>Enterococcus faecium</i> strains isolated from the intestinal content and carcasses of mallard ducks (<i>Anas platyrhynchos</i>)	95
Table III.4.	Purification of the antimicrobial activity of <i>Enterococcus hirae</i> DCH5	96
Table III.5.	Purification of the antimicrobial activity of <i>Lactococcus garvieae</i> DCC43	98

Capítulo IV/Chapter IV

Table IV.1.	Antimicrobial activity and inhibitory spectrum of the supernatant and the purified bacteriocin produced by <i>Enterococcus hirae</i> DCH5	107
Table IV.2.	Oligonucleotides used in DNA sequencing	108
Table IV.3.	Primers and plasmids used for heterologous expression of hiracin JM79 in <i>Lactococcus lactis</i>	108

Capítulo V/Chapter V

Table V.1.	Bacterial strains and plasmids used in this study	118
Table V.2.	Primers and PCR products used in this study	119
Table V.3.	Bacteriocin production and antimicrobial activity of supernatans from recombinant strains	121
Table V.4.	Production and antimicrobial activity of HirJM79 from supernatans of <i>Pichia pastoris</i> X-33TH grown in different media	122
Table V.5.	Purification of the antimicrobial activity of <i>P. pastoris</i> X-33TH	123

Capítulo VI/Chapter VI

Tabla VI.1.	Oligonucleotides used in PCR-amplification reactions and DNA sequencing	153
Tabla VI.2.	Antimicrobial activity and synergistic antimicrobial activity of the <i>in vitro</i> -synthesized EntL50A, EntL50B and EntJS	154
Tabla VI.3.	Production and antimicrobial activity of EntJS from supernatants of <i>P. pastoris</i> X-33JS grown in the complex medium BMMY	155
Tabla VI.4.	Purification of the antimicrobial activity of <i>P. pastoris</i> X-33JS	156
Tabla VI.5.	Production of EntL50A and EntL50B and antimicrobial activity of the supernatants from <i>E. faecium</i> L50 and <i>E. faecalis</i> DBH18	157
Tabla VI.6.	Antimicrobial activity and inhibitory spectrum of supernatants from <i>E. faecalis</i> DBH18 and <i>E. faecium</i> L50	158

Capítulo VII

Tabla VII.1.	Cebadores específicos para la detección por PCR de genes estructurales de diversas enterocinas.....	167
Tabla VII.2.	Comparación de la secuencia aminoacídica de la hiracina JM79, bacteriocina RC714, bacteriocina 31 y bacteriocina T8.....	176

LISTADO DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 2.1.	Esquema simplificado de la fermentación láctica.....	23
Figura 2.2.	Imágenes de <i>Enterococcus</i> spp obtenidas por microscopía electrónica.....	24
Figura 2.3.	Árbol filogenético basado en estudios comparativos de la fracción 16S del ARNr de diferentes especies de Enterococos.....	25
Figura 2.4.	Mecanismo de acción de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas.....	34
Figura 2.5.	Modelo de destrucción de células diana y mecanismo de inmunidad frente a la lactococina A y probablemente para otras bacteriocinas similares a las pediocinas.....	35
Figura 2.6.	(A) Organización de los determinantes genéticos que intervienen en la biosíntesis de la nisina A. (B) Modelo de biosíntesis de la nisina A.....	38
Figura 2.7.	Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la forma madura de las bacteriocinas de la clase IIa.....	39
Figura 2.8.	Papel de los filamentos de superficie ("pili") en una infección por <i>E. faecalis</i>	49
Figura 2.9.	Imágenes de microscopía electrónica con tinción de oro empleando anticuerpos anti-proteínas Ebp (del inglés "encoding endocarditis and biofilm-associated pili") en <i>E. faecalis</i> OG1RF.....	49
Figura 2.10.	Modelo para la expresión de la citolisina (Cyl) de <i>E. faecalis</i>	52
Figura 2.11.	Organización de los transportadores-ABC.....	59
Figura 2.12.	Secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas mediante un sistema de transporte dedicado (DTS) y el empleo de transportadores-ABC.....	60
Figura 2.13.	Modelo co-traducciona.....	63
Figura 2.14.	Modelo post-traducciona.....	64
Figura 2.15.	Mecanismo de translocación de proteínas Sec-dependientes.....	65
Figura 2.16.	(A) Procesamiento, transporte y secreción de proteínas en levaduras. (B) Reconocimiento del péptido señal y lugar de procesado de la feromona factor α de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
Figura 2.17.	Plásmido pNZ1710, un ejemplo de vector de expresión controlado por la nisina A (sistema NICE).....	78
Figura 2.18.	Macho y hembra de <i>Anas platyrhynchos</i>	82

Capítulo III/Chapter III

Figure 3.1.	PCR products from purified DNA from <i>E. faecalis</i> DBC4 amplified with primers for known virulence factors.....	95
Figure 3.2.	PCR amplification fragments of purified DNA from <i>E. faecium</i> L50 (A), <i>E. faecium</i> DCH2 (B) and <i>E. faecium</i> DCC14 (C) using the following primer pairs specific for the EntL50 operon and adjacent genes.....	96
Figure 3.3.	Mass spectrometry analysis of the purified antimicrobial peptide of <i>E. hirae</i> DCH5 (A) and <i>L. garvieae</i> DCC43 (B)	97

Capítulo IV/Chapter IV

Figure 4.1.	Genetic organization of the 2838-bp DNA sequence from <i>Enterococcus hirae</i> DCH5 containing the hiracin JM79 structural gene (<i>hirJM79</i>), the putative hiracin JM79 immunity gene (<i>hiriJM79</i>) and contiguous ORFs.....	109
Figure 4.2.	Nucleotide sequence of a 780-bp fragment containing the structural gene of hiracin JM79 (<i>hirJM79</i>) and its putative immunity gene <i>hiriJM79</i>	110
Figure 4.3.	(A). Antimicrobial activity of supernatants of: (a) <i>Lactococcus lactis</i> IL1403 (pMG36c), (b) <i>Lactococcus lactis</i> IL1403 (pJPH1), (c) <i>Lactococcus lactis</i> IL1403 (pJPH2), (d) <i>Lactobacillus sakei</i> LB790 (pMG36c), (e) <i>Lactobacillus sakei</i> Lb790 (pJPH1), and (f) <i>Lactobacillus sakei</i> Lb790 (pJPH2). (B). Antimicrobial activity of supernatants of: (g) <i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2 (pMG36c), (h) <i>E. faecalis</i> JH2-2 (pJPH2), (i) <i>Enterococcus faecium</i> L50/14-2 (pMG36c), (j) <i>E. faecium</i> L50/ 14-2 (pJPH2), (k) <i>E. faecium</i> P13, and (l) <i>Enterococcus hirae</i> DCH5	110

Capítulo V/Chapter V

Figure 5.1.	Antimicrobial activity of LAB cultures as determined by the ADT	120
Figure 5.2.	ADT for detection of the HirJM79 antimicrobial activity against <i>E. faecium</i> T136.....	122

Capítulo VI/Chapter VI

Figura 6.1.	PCR-amplification fragments of purified DNA from <i>E. faecium</i> L50 (A) and <i>E. faecalis</i> DBH18 (B), using primers EntL50-R1 and EntL50-R2 and an annealing temperature gradient of 50.8° C (lane 1), 52.5° C (lane 2), 55.2° C (lane 3), 57.1° C (lane 4), 59.0° C (lane 5), 61.0° C (lane 6), 63.5° C (lane 7), and 64.9° C (lane 8).....	159
Figura 6.2.	Nested PCR amplification of purified genomic DNA from <i>E. faecium</i> L50 and <i>E. faecalis</i> DBH18 to amplify fragments containing the <i>entL50A</i> and <i>entL50B</i> genes and surrounding ORFs (<i>orfG</i> , <i>orfF</i> , <i>orfE</i> , <i>orfD</i> , and <i>orfC</i>)	160
Figura 6.3.	Nucleotide sequence of a 901-bp fragment containing the predicted <i>entJS</i> , <i>orfB</i> and <i>orfC</i> genes.....	161

Capítulo VII

Figura 7.1.	Proporción de las diferentes especies de aislados	166
Figura 7.2.	Construcción del plásmido recombinante pPICH5 derivado del vector de expresión pPICZαA.....	184

ABREVIATURAS DE NUCLEÓTIDOS

A (AMP)	Adenina monofosfato o ácido adenílico
C (CMP)	Citosina monofosfato o ácido citidílico
G (GMP)	Guanosina monofosfato o ácido guanidílico
T (TMP)	Timidina monofosfato o ácido timidílico
U (UMP)	Uridina monofosfato o ácido uridílico

ABREVIATURAS Y MASA MOLECULAR DE AMINOÁCIDOS

Aminoácidos	Abreviaturas		Masa molecular (Da)
No modificados postraducionalmente			
Ácido aspártico	Asp	D	133
Ácido glutámico	Glu	E	147
Alanina	Ala	A	89
Arginina	Arg	R	174
Asparagina	Asn	N	132
Cisteína	Cys	C	121
Fenilalanina	Phe	F	165
Glicina	Gly	G	75
Glutamina	Gln	Q	146
Histidina	His	H	155
Isoleucina	Ile	I	131
Leucina	Leu	L	131
Lisina	Lys	K	146
Metionina	Met	M	149
Prolina	Pro	P	115
Serina	Ser	S	105
Tirosina	Tyr	Y	181
Treonina	Thr	T	119
Triptófano	Trp	W	204
Valina	Val	V	117
Modificados postraducionalmente			
Dehidroalanina	Dha	-	
Dehidrobutirina	Dhb	-	
Lantionina	Lan	-	
β-metil-lantionina	MeLan	-	

CÓDIGO GENÉTICO

U		C		A		G	
Primera posición (extremo 5')	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	Tercera posición (extremo 3')
		UUC }		UAC }		C	
		UUA } Leu		UAA * }		A	
		UUG }		UAG * }		G	
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U	
		CUC }		CAC }		C	
		CUA }		CAA } Gln		A	
		CUG }		CAG }		G	
	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U	
		AUC }		AAC }		C	
		AUA }		AAA } Lys		A	
		AUG } Met		AAG }		G	
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U	
		GUC }		GAC }		C	
		GUA }		GAA } Glu		A	
		GUG }		GAG }		G	

*Los codones de terminación de la traducción se indican con un asterisco.